A resistência à droga em parasitos *Leishmania (Leishmania) infantum*

e sua relação com a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos

Lucas Sousa Magalhães
Camilla Natália Oliveira Santos

Atena Editora
Ano 2022

A resistência à droga em parasitos

Leishmania (Leishmania) infantum

e sua relação com a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos

Lucas Sousa Magalhães
Camilla Natália Oliveira Santos

Atena Editora
Ano 2022

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Bruno Oliveira
Camila Alves de Cremo
Daphynny Pamplona
Luiza Alves Batista
Natália Sandrini de Azevedo
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

2022 *by Atena Editora*
Copyright © Atena Editora
Copyright do texto © 2022 Os autores
Copyright da edição © 2022 Atena Editora
Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.
Open access publication by Atena Editora

Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial
Ciências Biológicas e da Saúde
Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso
Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília
Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Atena
Editora
Ano 2022

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacl do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

A resistência à droga em parasitos Leishmania (Leishmania) infantum e sua relação com a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos

Diagramação: Daphynny Pamplona
Correção: Yaiddy Paola Martinez
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Autores: Lucas Sousa Magalhães
Camilla Natália Oliveira Santos

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M188 Magalhães, Lucas Sousa
A resistência à droga em parasitos Leishmania (Leishmania) infantum e sua relação com a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos / Lucas Sousa Magalhães, Camilla Natália Oliveira Santos. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-0227-5
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.275220306

1. Leishmaniose visceral. 2. Antimônio. I. Magalhães, Lucas Sousa. II. Santos, Camilla Natália Oliveira. III. Título.
CDD 616.9364

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os professores e estudantes do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Sergipe, em especial à Profa. Dra. Tatiana Moura, ao Prof. Dr. Roque Almeida e à Profa. Dra. Amélia de Jesus.

Além disso, agradecemos também às agências públicas de fomento, que são fundamentais para que pesquisas como essa possam acontecer: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE).

APRESENTAÇÃO

As doenças negligenciadas são um grupo de doenças infecciosas e parasitárias, que acometem principalmente populações economicamente desfavorecidas, pessoas que vivem expostas a condições de vida que levam a dificuldade de alimentação, cuidado com a saúde e maior exposição a situações de risco, ou seja, são populações negligenciadas.

O Brasil, um país de dimensões continentais e com grandes disparidades sociais e econômicas, é um dos países com maior número de doenças negligenciadas prevalentes na população. Dentre essas doenças, encontramos as leishmanioses, um conjunto de doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanioses podem se manifestar como uma doença infecciosa da pele, mais localizada e normalmente menos grave, ou em sua forma mais grave, a leishmaniose visceral, que atinge principalmente órgãos como fígado e baço, e pode evoluir para morte se não tratada a tempo.

No contexto da leishmaniose visceral, existe um problema atual que é o caso de pacientes que apresentam episódios de recidiva da doença, quando há falha terapêutica e a doença reaparece em algumas semanas após o caso inicial. Vários aspectos têm sido demonstrados como fatores importantes para que essa recidiva aconteça, entre eles características pertencentes aos parasitos, como a capacidade de resistir às drogas utilizadas no tratamento da doença. Essa resistência a droga tem sido demonstrada com grande importância em algumas regiões da Índia e novas evidências apontam também para as Américas, com a presença de diversos relatos de parasitos resistentes ao tratamento convencional da leishmaniose.

Vários estudiosos têm se dedicado a investigar essas características relacionadas a recidiva da leishmaniose visceral, entretanto muitas perguntas continuam abertas e é exatamente nesse contexto que o trabalho que constitui o presente livro busca se inserir. Através de metodologias clássicas e modernas, utilizando parasitos que foram isolados de pacientes com casos de recidiva, o trabalho buscou investigar os mecanismos envolvidos na resistência a droga e como essa resistência poderia interagir com células do sistema imune humano. Dessa maneira, o presente trabalho visa contribuir no melhor entendimento da doença, fornecendo novos conhecimentos básicos que possam levar a descobertas e protocolos, propiciando melhor qualidade de vida aos pacientes acometidos pela leishmaniose visceral.

SUMÁRIO

Os parasitos ***Leishmania*** e o histórico da Leishmaniose Visceral 1

A biologia dos parasitos do gênero ***Leishmania*** 2

A Epidemiologia da Leishmaniose Visceral 3

A resposta imune e a relação ***Leishmania*** com o organismo hospedeiro 5

O controle quimioterápico, refratariedade e resistência a droga 6

A Leishmaniose Visceral e o fenótipo dos parasitos ***Leishmania*** como protagonista desta doença 10

MATERIAIS E MÉTODOS 13

Aspectos éticos e obtenção das amostras 13

Os parasitos ***L. (L.) infantum*** selecionados para o estudo 13

O cultivo dos parasitos ***L. (L.) infantum*** 14

Ensaios de avaliação do tiol e bombas de transporte como mecanismos de resistência a droga 15

Determinação dos níveis de tiol em promastigotas de *L. (L.) infantum* 15

Bloqueio da síntese de tiol e avaliação da susceptibilidade ao antimônio 15

Bloqueio da síntese de tiol no tamponamento de EROS em promastigotas 16

Identificação de mecanismos de transporte 16

Obtenção e infecção de neutrófilos humanos 17

Preparo dos isolados para infecção de neutrófilos 17

Infecção de neutrófilos e análise por citometria de fluxo 18

Obtenção, cultura e infecção de macrófagos humanos 18

Bloqueio da síntese de tiol e a infecção de macrófagos 19

Infecção de macrófagos com *L. (L.) infantum* e diferentes condições de tratamento 20

Dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados 21

Análise estatística 21

Testes estatísticos 21

O FENÓTIPO DOS ISOLADOS RESISTENTES AO ANTIMÔNIO 22

A interação entre parasitos resistentes a droga e neutrófilos 27

A RELAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGA COM A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS 30

CONSIDERAÇÕES FINAIS 37

REFERÊNCIAS 38

SOBRE OS AUTORES 52

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa grave, endêmica no Brasil e causada por parasitos *Leishmania (Leishmania) infantum*. Os mecanismos microbicidas de macrófagos e neutrófilos estão relacionados a eliminação dos parasitos. A quimioterapia com compostos antimoniais é a principal forma de controle da doença. Nos últimos anos foram descritos inúmeros casos de pacientes refratários ao tratamento e parasitos resistentes a droga. Diante disso, o presente trabalho objetivou descrever o mecanismo de resistência ao antimônio em isolados de *L. (L.) infantum* resistentes a droga e a relação do mecanismo de resistência com a modulação da infecção de neutrófilos e macrófagos. Inicialmente, foi observado que os parasitos resistentes ao antimônio apresentam níveis elevados de compostos contendo tiol. O bloqueio da síntese de tiol nos isolados resistentes aumentou a sensibilidade desses parasitos ao antimônio e diminuiu a capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio. A análise da atividade de bombas P-gp que possuem capacidade de atuar no sequestro de droga não mostrou ser efetiva no fenótipo apresentado por esses parasitos. Já a infecção de neutrófilos com isolados resistentes e sensível a droga mostrou que não há diferenças na quantidade de células infectadas, na carga parasitária ou na produção de espécies reativas de oxigênio. Os resultados das infecções de macrófagos, previamente publicados, demonstraram que parasitos resistentes a droga tendem a apresentar maior capacidade de disseminação e que a ativação de mecanismos microbicidas pode contribuir no melhor controle dessa disseminação. Juntos, os dados apresentados aqui demonstram que os níveis elevados de tióis em parasitos resistentes ao antimônio estão associados a resistência a droga e resistência cruzada a mecanismos microbicidas. Indo além, o mecanismo de resistência pode estar associado a uma modulação da infecção de macrófagos que pode ser mais bem controlada pela ativação da resposta pró-inflamatória.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania*. Leishmaniose visceral. Antimônio. Evasão da resposta imune.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a serious infectious disease endemic in Brazil and caused by Leishmania (Leishmania) infantum parasite. The microbicide mechanisms of macrophages and neutrophils are related to the elimination of parasitism. Chemotherapy with antimonial compounds is the main form of disease control. In recent years, numerous cases of treatment-resistant patients and drug-resistant parasites have been reported. Therefore, the present work aimed to describe the mechanism of resistance to antimony in drug-resistant L. (L.) infantum isolates and the relationship of the resistance mechanism with the modulation of neutrophil and macrophage infection. Initially, it was observed that antimony-resistant parasites have high levels of thiol-containing compounds. The blockade of thiol synthesis in resistant isolates increased the sensitivity of these parasites to antimony and decreased the neutralization capacity of reactive oxygen species. The analysis of the activity of P-gp pumps that can act in drug sequestration did not show to be effective in the phenotype presented by these parasites. On the other hand, neutrophil infection with drug-resistant and drug-sensitive isolates showed that there are no differences in the number of infected cells, parasitic load or production of reactive oxygen species. The results of macrophage infections, previously published, demonstrated that drug-resistant parasites tend to have greater dissemination capacity and that the activation of microbicide mechanisms can contribute to better control of this dissemination. Together, the data presented here demonstrate that high levels of thiols in antimony-resistant parasites are associated with drug resistance and cross-resistance to microbicide mechanisms. Going further, the resistance mechanism may be associated with a modulation of macrophage infection that can be better controlled by the activation of the pro-inflammatory response.

KEYWORDS: *Leishmania*. Visceral leishmaniasis. Antimony. Immune response evasion.

LEISHMANIOSE VISCERAL: UMA BREVE REVISÃO

1 | OS PARASITOS *LEISHMANIA* E O HISTÓRICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem ao reino Protista, a classe Kinetoplastea, a ordem Trypanosomatida, a família Trypanosomatidae, a subfamília Leishmaniinae e ao gênero *Leishmania*, onde vinte e duas espécies são capazes de infectar o organismo humano (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2019). Esses parasitos são transmitidos pela picada de flebotomíneos da subfamília *Phlebotominae,* principalmente dos gêneros *Phlebotomus* spp. ou *Lutzomyia* spp.

Os parasitos desse gênero foram observados pela primeira vez ainda no século XIX, próximo a virada do novo século, descritos e identificados de forma independente por diferentes estudiosos, denominados genericamente de *Leishmania* em 1903 por Ronald Ross (STEVERDING, 2017). Nas Américas, o primeiro caso de Leishmaniose Visceral (LV) descrito é datado de 1913, enquanto que no Brasil, apenas em 1934 foram confirmados os primeiros casos a partir da análise de tecido hepático de 41 pacientes acometidos com LV em diferentes estados do país (CHAGAS; CUNHA; FERREIRA; et al., 1938; LAINSON, 2010). A história da LV em Sergipe, se confirma e coincide com o histórico da doença no país, onde desde 1934 há descrição de casos de LV humana no estado (TAVARES; TAVARES, 1999).

Três subgêneros podem ser definidos dentro do gênero *Leishmania*: *Leishmania,* classicamente presente no Velho Mundo; *Viannia*, classicamente presente no Novo Mundo; e o subgênero mais recentemente proposto, *Mundinia* (KOSTYGOV; YURCHENKO, 2017). Para os subgêneros classicamente utilizados e sabidamente conhecidos por causar doenças em humano, *Leishmania* e *Viannia,* a diferenciação na classificação é feita de acordo com o tipo de desenvolvimento ocorrido no trato digestivo do flebotomíneo, sendo o desenvolvimento direto dos parasitos na região do intestino médio, característica do subgênero *Leishmania*, e migração para o intestino posterior e retorno ao intestino médio para desenvolvimento dos parasitos, característica do subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 2010). Já o subgênero *Mundinia* é típico de espécies que não causam doença em humanos, mas que vêm sendo cada vez mais presentes em relatos de infecções em humanos (ESPINOSA; SERRANO; CAMARGO; et al., 2016; SERENO, 2019).

Há uma distribuição regional nas formas da doença em relação aos subgêneros e espécies, na qual são formados complexos com diferentes espécies que desenvolvem formas similares de leishmaniose em regiões distintas. A LV é causada pelas espécies do complexo *L. donovani*, que inclui as espécies: *L. (L.) donovani*, relacionada à LV principalmente no subcontinente indiano; *L. (L.) infantum*, relacionado a casos de LV na região do Mediterrâneo e nas Américas, onde ocorre como uma antropozoonose, ou seja,

é uma doença primariamente de animais que pode acometer humanos (READY, 2014).

Havia ainda a espécie *L. (V.) chagasi*, agente causador da LV nas Américas, que foi reclassificada no começo dos anos 2000 (LUKES; MAURICIO; SCHÖNIAN; et al., 2007; KUMAR, 2013). Em 1937, Cunha e Chagas denominaram o agente etiológico da LV nas Américas de *L. chagasi*, após resultados negativos de infecção de modelos roedores experimentais utilizados na Europa com *L. infantum* (LAINSON, 2010). O avanço de técnicas moleculares, permitiu a descoberta de similaridades genéticas entre essas duas espécies, que seriam uma única espécie ou subespécies diferentes de um mesmo ancestral. Apesar de características moleculares coincidentes, há todo um espectro de diferenças no que se refere a forma clínica das doenças, a imunologia e patologia no organismo hospedeiro e a ecoepidemiologia desses parasitos, o que torna necessário estudos mais aprofundados na área (LAINSON; RANGEL, 2005; DANTAS-TORRES, 2006; SHAW, 2006; SILVEIRA; CORBETT, 2010). No presente estudo, optou-se pelo uso da terminologia *Leishmania Leishmania infantum*.

2 | A BIOLOGIA DOS PARASITOS DO GÊNERO *LEISHMANIA*

Os parasitos *Leishmania* são protozoários digenéticos, apresentando duas formas de vida: promastigotas e amastigotas. As promastigotas flageladas desenvolvem-se e multiplicam-se no trato digestivo do flebotomíneo, enquanto as amastigotas residem e se multiplicam nos vacúolos fagocitários das células de mamíferos (AKHOUNDI; KUHLS; CANNET; et al., 2016; SUNTER; GULL, 2017).

Estruturalmente, as formas promastigotas possuem corpo celular fusiforme medindo de 5 a 20 μm de comprimento por 1 a 4 μm de largura e com flagelo chegando até 20 μm de comprimento. O flagelo emerge anteriormente no corpo celular por meio de uma estrutura chamada bolsa flagelar que atua também na captação de moléculas do meio externo. Já a forma intracelular amastigota tem formato arredondado e menor, de 2 a 4 μm, com flagelo quase completamente internalizado no corpo celular. O cinetoplasto é uma estrutura característica da ordem desses protozoários e está presente nas duas formas de vida. É uma dilatação mitocondrial com anéis de DNA de cinetoplasto (kDNA), que fornece energia para movimentação do flagelo. A mitocôndria é única, alongada e percorre toda estrutura do corpo celular. Outras estruturas de células eucarióticas também estão presentes: núcleo, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002; DE SOUZA, 2008; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

O passo inicial para o estabelecimento da doença é a inoculação no hospedeiro de promastigotas infectivas (metacíclicas), no momento do repasto sanguíneo que estão presentes na saliva de flebotomíneos fêmeas infectadas. A saliva do inseto contém diversos elementos que contribuem na formação de uma resposta inflamatória, recrutando células de

defesa (PRATES; ARAÚJO-SANTOS; BRODSKYN; et al., 2012; DEY; JOSHI; OLIVEIRA; et al., 2018). De modo simultâneo, as formas infectivas expressam em sua membrana diferentes tipos de glicoconjugados, que estimulam a aderência e desencadeiam a fagocitose ou invasão de células, especialmente de macrófagos (LODGE; DESCOTEAUX, 2008). As promastigotas internalizadas em vacúolos parasitóforos ácidos se diferenciam em amastigotas, sem motilidade, que são capazes de sobreviver a acidez e realizar divisão binária (LODGE; DESCOTEAUX, 2008). Por sua vez, após ciclos de divisão, o número de amastigotas dentro das células induz o rompimento das membranas liberando parasitos amastigotas que podem infectar novas células, sejam macrófagos ou fibroblastos, por exemplo (BOGDAN; DONHAUSER; DÖRING; et al., 2000).

Durante o repasto sanguíneo, um flebotomíneo fêmea pode ingerir células infectadas com amastigotas. No flebotomíneo, durante a digestão do alimento, essas formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas (não-infectivas), que invadem o tecido epitelial intestinal do flebotomíneo. Em consequência dessa dinâmica, é iniciada a metaciclogênese, onde as promastigotas se diferenciam até o estágio infectivo (SACKS, 1989). Essas formas migram pelo tecido do trato intestinal até a região anterior, se acumulando na válvula estomodeal, onde formam um *pool* de parasitos que podem ser inoculados durante o próximo repasto sanguíneo. Caso não sejam inoculados, esses parasitos infectivos podem voltar a estágios preliminares, se multiplicarem e ao atingir novamente a capacidade de virulência, serem inoculados em um hospedeiro mamífero (SERAFIM; COUTINHO-ABREU; OLIVEIRA; et al., 2018).

3 | A EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são amplamente distribuídas e endêmicas em 102 países, localizadas na América, África, Ásia e Europa, com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas com risco de infecção (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2019). São doenças que geralmente acometem a população mais pobre e estão relacionadas a fatores como má nutrição, condições precárias de moradia, sistema imune debilitado, deslocamento populacional e ausência de recursos financeiros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a).

Fatores de risco relacionados ao comportamento humano, como a migração por fronteiras internacionais têm contribuído na mudança da dinâmica de distribuição das leishmanioses. Nos últimos anos, houve um aumento do número de casos de leishmaniose no mundo, com destaque para a ocorrência da doença em regiões onde antes não havia registro. Este fato está vinculado, entre outros fatores, aos conflitos armados e mudanças climáticas. Estudos recentes demonstram que populações refugiadas em campos de concentrações, em fuga dos conflitos armados, como também soldados presentes em conflitos em áreas endêmicas para leishmanioses, têm modificado a dinâmica de

transmissão das leishmanioses nessas áreas. Além disso, o aquecimento global causado gerado nas mudanças climáticas pode estar envolvido no avanço das leishmanioses para áreas onde anteriormente o ciclo dos parasitos seria menos viável, com condições climas mais frios (LINDGREN; ANDERSSON; SUK; et al., 2012; DU; HOTEZ; AL-SALEM; et al., 2016; REHMAN; WALOCHNIK; MISCHLINGER; et al., 2018). Contudo, mesmo quando ocorre em locais não endêmicos, as pessoas acometidas pelas leishmanioses, em sua maior parte, estão em áreas pobres afastadas de grandes centros de tratamento em saúde, sejam elas urbanas ou rurais (REHMAN; WALOCHNIK; MISCHLINGER; et al., 2018).

Atendo-se à leishmaniose visceral (LV), 94% de seus casos se concentram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, de acordo com dados de 2017 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b). Anualmente, são estimados de 200 a 400 mil novos casos da LV no mundo, com aproximadamente 20 a 40 mil mortes (ANVERSA; TIBURCIO; RICHINI-PEREIRA; et al., 2018). Nas Américas a LV é endêmica em 12 países e foi observado um total de 59,769 casos entre 2001 e 2017. Em 2017 houve um aumento no número total de casos de LV nas Américas atribuído ao aumento de 28% no número de casos de LV no Brasil, quando comparado ao ano de 2016 (WHO-PAHO, 2019).

De uma maneira geral o Brasil tem demonstrado aumento no número de casos de LV, com predomínio na região Nordeste e uma intensa expansão na região Norte. Nessa expansão territorial da LV no Brasil, tem sido demonstrada uma urbanização da doença, com cerca de 70% dos casos concentrados em áreas urbanas (DOS REIS; BALIEIRO; FONSECA; et al., 2017). Já em Sergipe nos dias atuais, a capital Aracaju, maior área urbana do estado, continua classificada como área de transmissão intensa, com aumento gradativo de casos de LV humanos entre 2008 e 2014 (CAMPOS; SANTOS; TUNON; et al., 2017). E apesar dos esforços para o controle da doença, entre os anos 2000 a 2018, a letalidade aumentou de 3,2 para 7,8% no Brasil. Enquanto em Sergipe, no ano de 2018, foi observado uma taxa de letalidade da LV de 14.3% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

4 | A RESPOSTA IMUNE E A RELAÇÃO *LEISHMANIA* COM O ORGANISMO HOSPEDEIRO

Do ponto de vista experimental, na infecção de modelo murino ou células *in vitro,* por se tratar de um parasito intracelular obrigatório, o controle da infecção de parasitos *Leishmania* é feito principalmente por macrófagos ativados e maturados por linfócitos T CD4+, resultado de uma resposta imune celular do tipo Th1. Por outro lado, a resposta imune humoral Th2 tem sido associada a permissividade da infecção e disseminação dos parasitos, juntamente com a capacidade de evasão e subversão da resposta imune efetora desencadeada pelos parasitos (SHARMA; SINGH, 2009; KUMAR; NYLÉN, 2012).

Inicialmente, já no momento do repasto sanguíneo, a saliva do flebotomíneo vetor

injetada no tecido do hospedeiro, o processo de inoculação da probóscide no tecido cutâneo, e a criação da poça de alimentação, são capazes de estimular um processo inflamatório, atraindo células hospedeiras, como neutrófilos (PRATES; ARAÚJO-SANTOS; BRODSKYN; et al., 2012; TEIXEIRA; SANTOS; PRATES; et al., 2018).

Os neutrófilos têm sido demonstrados como essenciais na resposta a ser desencadeada por outras células, tendo um papel permissivo ou controlador dos parasitos. A liberação de mediadores inflamatórios e enzimas presentes em seus grânulos, simultaneamente com a atuação de outras células, torna a primeira linha de defesa capaz de controlar a infecção (CARLSEN; LIANG; SHELITE; et al., 2015). Tem sido demonstrado a atuação de outro importante mecanismo de neutrófilo no controle de infecções, as NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), capazes de controlar a propagação dos parasitos (GUIMARÃES-COSTA; NASCIMENTO; FROMENT; et al., 2009). Estudos demonstram que diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de subverter a resposta dos neutrófilos, transformando-os em facilitadores da infecção de forma direta ou indireta (JOHN; HUNTER, 2008). É demonstrado também que parasitos *Leishmania* podem clivar as NETs, escapando da imobilização (MARQUES; PASSERO; VALE-GATO; et al., 2015). Dados recentes demonstram ainda a participação da via do TREM (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells*), receptores especialmente expressos em neutrófilos, como importante marcador da gravidade da LV e ainda como uma possível e importante via utilizada pelos parasitos *Leishmania* na modulação da resposta imune (BOMFIM; MAGALHÃES; SANTOS-FILHO; et al., 2017).

Outra barreira inata ao estabelecimento da infecção por *Leishmania* é a atuação do sistema complemento. Esse conjunto de proteínas solúveis do plasma possui alta capacidade de romper promastigotas de *Leishmania* nos primeiros minutos de exposição experimental *in vitro*. Entretanto, a pressão seletiva natural desses parasitos levou ao desenvolvimento de fatores de virulência capazes de evadir a essa resposta. A leishmanolisina, ou GP63, e o lipofosfoglicano (LPG) podem atuar, em diferentes espécies de *Leishmania*, neutralizando o sistema complemente e evitando a eliminação dos parasitos. É demonstrado que essas moléculas podem utilizar o complemento para facilitar a entrada dos parasitos nos macrófagos, permitindo a sua sobrevivência nos mesmos (DOMÍNGUEZ; MORENO; LÓPEZ-TRASCASA; et al., 2002; GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

Os macrófagos, além de serem as mais importantes células hospedeiras para parasitos *Leishmania*, também atuam como importante forma de controle da infecção. Espécies de *Leishmania* são capazes de induzir a polarização de ambos os fenótipos de macrófagos, os chamados de classicamente ativados (M1), relacionados a resposta Th1/ IFN-γ, e os alternativamente ativados (M2), relacionados a resposta Th2/IL-4 e reparação tecidual. Estudos demonstram que macrófagos M2 são permissivos a proliferação de parasitos *Leishmania*, enquanto o fenótipo M1 está relacionado ao papel leishmanicida,

produzindo espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (LOPES; COSTA-DA-SILVA; DOSREIS, 2014; SILVA; SANTOS; ALMEIDA; et al., 2017; MARTÍNEZ-LÓPEZ; SOTO; IBORRA; et al., 2018).

O papel essencial do óxido nítrico (NO) no controle da infecção por Leishmania tem sido demonstrado por muitos anos. Inicialmente, a liberação de citocinas ativadoras, como IFN-γ, induzem a produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Essa enzima desencadeia a conversão de L-arginina em NO que, por sua vez, atua interferindo diretamente na desestabilização de vias celulares vitais aos parasitos, como na ligação e reação de metaloproteínas e proteínas cisteínas, impedindo a continuidade do ciclo de respiração oxidativa mitocondrial (REINHARD; HUBER; LOHOFF; et al., 2012; ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Para que a resposta microbicida efetora seja eficaz é necessário a participação dos linfócitos T auxiliares (Th), que agem no reconhecimento dos parasitos e na maturação da resposta, tornando-a mais específica. Na LV, diferente de outras formas de leishmaniose, não é possível destacar uma dicotomia entre a presença e atuação das respostas imune Th1 e Th2. Enquanto estudos experimentais e in vitro apontam claramente o papel benéfico da resposta Th1, com liberação de citocinas pro-inflamatórias e ativação de mecanismos microbicidas, os estudos sorológicos em pacientes com as formas clássica ou grave da LV demonstram a existência de variações na presença de diferentes interleucinas, com uma alta secreção de citocinas de ambos os perfis (IL-2, INF-γ, IL-12, IL-4, TGF-β, IL-10), quadro chamado de tempestade de citocinas (MANSUETO; VITALE; DI LORENZO; et al., 2007; KAYE; SCOTT, 2011; SHIO; HASSANI; ISNARD; et al., 2012; DOS SANTOS; DE OLIVEIRA; SANTOS; et al., 2016).

Classicamente, a literatura tem demonstrado a importância da IL-10 no estabelecimento da doença e sobrevivência dos parasitos. A IL-10 atua modulando o meio e permitindo a sobrevivência dos macrófagos. Essa modulação negativa implica na transformação do macrófago em uma célula não responsiva, deficiente em produzir radicais livres antimicrobianos, mas eficaz no reparo tecidual e anti-inflamatório. Entretanto, como exposto anteriormente, a presença de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias no soro de pacientes com leishmaniose visceral indica que não há uma resposta clara e polarizada associada ao controle dos parasitos ou a gravidade da doença (NYLÉN; SACKS, 2007; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; ARAÚJO-SANTOS; ANDRADE; GIL-SANTANA; et al., 2017).

Baseando-se no mecanismo imune, a forma clínica relacionada aos organismos humanos hospedeiros torna-se mais clara. Os macrófagos infectados pelas espécies viscerotrópicas se localizam essencialmente no fígado, baço e medula óssea. Após o período de incubação dos parasitos, que pode levar de dias a anos, o parasitismo

pode desencadear sinais e sintomas clínicos como febre, caquexia, pancitopenia, hipergaglobulinemia e hipoalbuminemia. O tropismo tecidual leva a um quadro clínico com aplasia medular e hepatoesplenomegalia progressiva. A infecção pode se tornar crônica, com presença de recaídas, ocasionadas pela cura não estéril, e casos de oportunismo em indivíduos não sintomáticos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SINGH; HASKER; SACKS; et al., 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Outro quadro alarmante e em ascensão é a coinfecção *Leishmania* em pacientes HIV positivos que, por apresentarem um sistema imune comprometido, tornam-se mais susceptíveis a proliferação dos parasitos. A má nutrição e a exposição constante aos parasitos, aumentando a carga parasitária, são situações mais comuns para indivíduos com pior condição socioeconômica, as chamadas populações negligenciadas. A situação de vida dessas populações pode contribuir favorecendo a infecção e a doença.

5 | O CONTROLE QUIMIOTERÁPICO, REFRATARIEDADE E RESISTÊNCIA A DROGA

A quimioterapia é a principal forma de tratamento dos pacientes e controle da LV. Sua efetividade depende de fatores relacionados o sistema imune do hospedeiro, as características farmacológicas da droga e a fatores intrínsecos dos parasitos (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Por décadas, o uso de compostos antimoniais (Sb) tem predominado como primeira escolha de tratamento. A administração desses compostos antimoniais se iniciou em 1912, quando Gaspar Vianna fez o uso de tártaro emético (forma trivalente do antimonial) e observou resultados positivos no controle da leishmaniose cutânea. Porém, a alta toxicidade desses compostos tornava seu uso terapêutico inviável. Anos depois, em 1936, Schmidt introduziu o uso dos antimoniais pentavalentes na prática clínica. A partir disso, desde os anos 1940 os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados no controle terapêutico das leishmanioses. Atualmente, as drogas antimoniais pentavalentes (SbV) mais utilizadas são estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®), utilizada no Brasil (RATH; TRIVELIN; IMBRUNITO; et al., 2003; NO, 2016).

A forma pentavalente é considerada uma pró-droga que necessita de conversão para forma reduzida trivalente (SbIII), que tem efeito tóxico direto nos parasitos e pode atuar na potencialização do sistema imune do hospedeiro. Essa transformação pode ser feita no fígado, onde a forma SbV se encontra em altas concentrações, como também no plasma e no baço. O SbV tem meia-vida de 24h, sendo que cerca de metade da concentração de droga injetada é excretada nas primeiras 24h, enquanto o SbIII tem uma alta taxa de absorção e excreção, com meia vida em torno de 2 horas. As características farmacocinéticas e tóxicas desses compostos geram um quadro com diversas reações adversas podendo apresentar cardiotoxicidade (arritmias, taquicardia, fibrilação), alterações hepáticas e pancreáticas,

artralgia e mialgia (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Apesar de utilizados por décadas no controle das leishmanioses, o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está completamente esclarecido. Sabe-se que o SbIII é tóxico para ambas as formas de *Leishmania*¸ amastigotas e promastigotas. Apesar das controvérsias, estudos têm demonstrado a ação desses compostos em vias metabólicas essenciais à sobrevivência dos parasitos, que culminam na redução do suprimento energético e na produção de moléculas oxidativas nos parasitos, que levam a destruição das estruturas celulares. Estudos indicam a ação direta do SbIII em enzimas da via glicolítica, inibindo a fosforilação de difosfato de adenosina (ADP) e na β-oxidação de ácidos graxos, ainda podendo se ligar a ribose, formando complexos nucleosídeos de adenina, que agem como bloqueadores do transporte de purinas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; CROFT; OLLIARO, 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013; PONTE-SUCRE; GAMARRO; DUJARDIN; et al., 2017).

Dadas as características farmacológicas, as limitações do uso dos antimoniais levou a utilização clínica de outros compostos no tratamento das leishmanioses, principalmente para a LV, forma mais grave. A anfotericina B, composto antifúngico, é normalmente a droga de segunda escolha para as leishmanioses ou primeira escolha em alguns países, pois tem apresentado alta efetividade. Em suas duas principais formulações, lipossomal e desoxicolato, esse composto tem alta efetividade na eliminação de *Leishmania*. Entretanto, o alto custo e a presença de efeitos tóxicos também limitam seu uso (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007; LOCKWOOD; MOORE, 2010).

Já a miltefosina é um composto anticancerígeno, com espectro de ação leishmanicida bem caracterizado *in vitro*. Estudos têm sido realizados buscando o desenvolvimento de medicamentos baseados nesse composto. Paromomicina e pentamidina são compostos anti-protozoários que tem eficácia demonstrada em alguns estudos para o tratamento da LV (CHAPPUIS; SUNDAR; HAILU; et al., 2007; PELISSARI; CECHINEL; SOUSA-GOMES; et al., 2011). Contudo, apesar da existência de alguns medicamentos comerciais e estudos sobre novos compostos para o tratamento da LV, a principal droga utilizada no mundo e no Brasil são os compostos antimoniais (SERENO; HARRAT; EDDAIKRA, 2019).

Por volta da década de 1980 na região de Bihar, na Índia, começaram a surgir casos de refratariedade ao tratamento com os antimoniais pentavalentes. Esse quadro de refratariedade pode surgir devido a alterações em algum dos elementos que se somam para efetividade da droga, elementos que dependem da fisiologia do organismo hospedeiro, das propriedades farmacológicas da droga e das características próprias dos parasitos. Nesses casos na Índia, assim como em diversos casos descritos em estudos de diferentes regiões, características de resistência a droga presentes nos parasitos *Leishmania* foram demonstradas como fatores importantes no desenvolvimento da refratariedade clínica.

Inúmeros esforços têm sido tomados buscando o desenvolvimento de novas abordagens eficazes contra os parasitos e na compreensão dos mecanismos de resistência (MALTEZOU, 2010; FREITAS-JUNIOR; CHATELAIN; KIM; et al., 2012; PONTE-SUCRE; DIAZ; PADRÓN-NIEVES, 2013; CATTA-PRETA; MOTTRAM, 2018).

Entre os mecanismos de resistência descritos, alguns são bem estabelecidos, normalmente envolvendo o aumento ou diminuição na expressão de bombas de transporte e enzimas naturalmente expressas nos parasitos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; FRÉZARD; MONTE-NETO; REIS, 2014). O transportador transmembrana Aquagliceroporina, presente em variadas classes e espécies, é responsável pela captação de metaloides para o meio intracelular. Na *Leishmania*, a Aquagliceroporina-1 (AQP-1), tem sido apontada como responsável pela captação do SbIII para a célula. A superexpressão dessa molécula torna espécies de *Leishmania* hipersensíveis ao antimonial, enquanto a sua regulação negativa tem sido relacionada e evidenciada em parasitos com maior resistência a droga (BROCHU; WANG; ROY; et al., 2003; MAHARJAN; SINGH; CHATTERJEE; et al., 2008).

Além da AQP1, transportadores da superfamília ABC têm sido descritos e relacionados a resistência aos antimoniais em *Leishmania* (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004). Essa superfamília é um domínio intracelular conservado por diferentes espécies. Através do transporte ativo dependente de ATP, essas bombas podem ser capazes de retirar a droga do meio intracelular ou sequestrar em vesículas, diminuindo a concentração e toxicidade no parasito (BROTHERTON; BOURASSA; LEPROHON; et al., 2013; LEPROHON; FERNANDEZ-PRADA; GAZANION; et al., 2015).

Dois tipos de bombas ABC são descritos e relacionados a *Leishmania* resistentes aos antimoniais. O primeiro deles é relacionado a membrana celular e não está bem esclarecido, mas trabalhos têm demonstrado a presença de uma proteína de 170 kDa, do tipo glicoproteína-P (P-gp), conhecido como proteína multidroga resistente 1 (MDR-1), e que se localiza na membrana celular, responsável pelo efluxo direto do antimonial para fora da célula (MESSARITAKIS; CHRISTODOULOU; MAZERIS; et al., 2013; AUSTRUP; KARANIS, 2014). O segundo tipo de bomba é o transportador MRPA (proteína multidroga resistente A), também conhecido como PGPA, pertencente a subfamília ABCC3 (MOREIRA; MONTE NETO; ANDRADE; et al., 2013). Essas bombas do tipo MRPA foram descritos presentes na membrana de vesículas e vacúolos próximos a bolsa flagelar, o que permite a exocitose da droga captada e internalizada. Entretanto, o sequestro da droga por essas moléculas MRPA, está relacionado a complexos metal-tiol, ou seja, o antimonial necessita ser complexado com tióis celulares (LÉGARÉ; RICHARD; MUKHOPADHYAY; et al., 2001).

Os compostos contendo tiol, proteicos ou peptídeos não proteicos, estão relacionados a sobrevivência e proliferação dos parasitos. A moléculas contendo tiol atuam diretamente no controle e manutenção do meio intracelular contra compostos tóxicos e radicais livres,

como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (KRAUTH-SIEGEL; INHOFF, 2003; COLOTTI; ILARI, 2011). A tripanotiona, principal molécula contendo tiol em parasitos *Leishmania*, se origina numa complexa via bioquímica e tem em sua base a união de uma glutationa, molécula antioxidante encontrada também em mamíferos (produzida também pelos macrófagos), e uma espermidina, uma poliamina capaz de desempenhar papeis importantes no metabolismo celular (TURCANO; TORRENTE; MISSINEO; et al., 2018). Estudos têm demonstrado que a via da tripanotiona é alvo da ação do tratamento com compostos antimoniais e uma expressão aumentada dessa via, com aumento da síntese de tiol/tripanotiona, está associada a resistência ao antimônio pela inativação da forma ativa da droga (MUKHOPADHYAY; DEY; XUT; et al., 1996; KRAUTH-SIEGEL; INHOFF, 2003; YAN; LI; DING; et al., 2003).

O aumento na síntese de ornitina descarboxilase, γ-glutamilcisteína sintetase e tripanotiona redutase (enzimas da via precursora dos tióis) fazem um equilíbrio favorável ao parasito frente ao antimonial, por meio do aumento na síntese de tiol e consequente conjugação, sequestro e extrusão da droga (SHIM; FAIRLAMB, 1988; GÓMEZ PÉREZ; GARCÍA-HERNANDEZ; CORPAS-LÓPEZ; et al., 2016). Além disso, trabalhos demonstram que os tióis podem atuar como redutores da pró-droga SbV para forma ativa SbIII e serem possíveis alvos de ação da droga, enquanto a superexpressão de tióis induz a neutralização da droga e permite a sobrevivência dos parasitos (DOS SANTOS FERREIRA; SILVEIRA MARTINS; DEMICHELI; et al., 2003).

Além de estarem estritamente ligadas a resistência aos antimoniais, essas alterações moleculares podem atuar também modificando a resposta imune do organismo hospedeiro, facilitando a evasão e sobrevivência dos parasitos. Mukherjee et al. (2013)demonstraram que a expressão de bombas MDR-1 (transportadores ABC) está ligada a presença de IL-10 estimulada pelos próprios parasitos resistentes. Entretanto, são poucos os trabalhos que buscaram compreender o papel dos mecanismos de resistência a droga como fatores de virulência na interação com a resposta imune do hospedeiro.

6 | A LEISHMANIOSE VISCERAL E O FENÓTIPO DOS PARASITOS *LEISHMANIA* COMO PROTAGONISTA DESTA DOENÇA

Como visto anteriormente, a LV é um grave problema de saúde pública que pode levar a morte. O estabelecimento da doença depende da evasão e modulação negativa dos mecanismos imunes efetores. Os macrófagos têm sua capacidade microbicida diminuída com o estabelecimento da infecção. Isso afeta diretamente a relação dos macrófagos com outros tipos celulares efetores, como os neutrófilos e linfócitos, modulando a resposta imune desencadeada (NOVAIS; SANTIAGO; BÁFICA; et al., 2009; KUMAR; NYLÉN, 2012; CARLSEN; LIANG; SHELITE; et al., 2015; GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

Por outro lado, o controle da doença estabelecida consiste no uso de compostos quimioterápicos adotados há mais de setenta anos, principalmente porque ainda não há disponível qualquer tipo de vacinação, apesar dos vários esforços para se obter uma vacina (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). Paralelo a isso, estudos têm demonstrado a presença de refratariedade ao tratamento por antimoniais e essa refratariedade pode estar relacionada a droga e suas características farmacológicas, como também ao estado imune do organismo hospedeiro e ainda as características intrínsecas dos parasitos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Somado a isso, relatos de casos de refratariedade e resistência as drogas alternativas tem surgido na literatura em regiões altamente endêmicas e em que há anos o antimonial apresenta baixa capacidade de eliminação dos parasitos, mostrando a importância de encontrar novos meios para o controle da doença, não apenas baseados em medicamentos (SRIVASTAVA; MISHRA; GUPTA; et al., 2017).

Dentre os fenótipos de resistência a droga encontrados naturalmente e artificialmente, os mecanismos de resistência são avaliados principalmente pelas características moleculares dos parasitos, que apresentam diferenças nos níveis de RNA mensageiro de proteínas de diferentes vias metabólicas. As altercações observadas estão associadas principalmente a maior expressão de bombas de sequestro da droga, diminuição da expressão de proteínas transportadoras da droga para o meio intracelular, bem como maior expressão de moléculas que se conjugam e inativam a droga (AIT-OUDHIA; GAZANION; OURY; et al., 2011; AÏT-OUDHIA; GAZANION; VERGNES; et al., 2011; JEDDI; MARY; AOUN; et al., 2014). Parasitos que apresentam resistência ao tratamento também têm sido evidenciados com capacidades de modular a resposta imune. Na infecção *in vitro* de macrófagos, os parasitos são capazes de induzir a produção de IL-10 e as promastigotas de *Leishmania* podem resistir a espécies reativas de nitrogênio (SANTOS; COSTA; BRAZ; et al., 2012; MUKHERJEE; MUKHOPADHYAY; BANNERJEE; et al., 2013).

Indo além das mudanças moleculares relacionadas a resistência a droga, cada vez mais estudos demonstram variabilidades encontradas nos parasitos de diferentes regiões geográficas ou mesmo de diferentes cepas de uma mesma região, que interferem no comportamento dos parasitos *per si* ou na interação com os componentes da resposta imune. Trabalhos evidenciam uma grande plasticidade dos parasitos *Leishmania*, assim como também de outros gêneros da subfamília *Leishmaniinae* e demonstram variabilidades moleculares desses parasitos (IANTORNO; DURRANT; KHAN; et al., 2017). Espécies e gêneros antes nunca relacionados à infecção em humanos têm sido observados em casos esporádicos, mas crescentes e se tornando endêmicas, como dos gêneros *Leptomonas* spp., *Crithidia* spp. e a reclassificação da espécies emergentes como *Leishmania (Mundinia) orientalis* (SINGH; CHIKARA; SUNDAR, 2013; KRAEVA; BUTENKO; HLAVÁČOVÁ; et al., 2015; JARIYAPAN; DAROONTUM; JAIWONG; et al., 2018; KALANTARI; MOTAZEDIAN; ASGARI; et al., 2018; GHOBAKHLOO; MOTAZEDIAN; NADERI; et al., 2019).

Novas tecnologias permitem o entendimento dessas mudanças que se somam

aos esforços para elucidar antigas questões como a ineficiência da resposta imune de alguns indivíduos aos parasitos, a capacidade de subversão da resposta microbicida pelos parasitos e a resistência ao antimônio. Nos últimos anos, trabalhos do grupo de pesquisa vêm caracterizando principalmente a resposta imune em pacientes com LV, a resposta imune *in vitro* em células de pacientes e controles endêmicos saudáveis.

Trabalhos anteriores propuseram as diferentes cepas de *Leishmania (L.) infantum* isoladas de pacientes como protagonistas e demonstraram que os isolados obtidos de pacientes refratários ao tratamento com antimonial foram resistentes *in vitro* ao NO (DOS SANTOS, 2011), que o perfil de ácidos graxos dos isolados podem variar de acordo com sua resistência ao NO (DE AZEVEDO, 2013) e que as EROS são importantes agentes leishmanicidas, mas parasitos podem resistir tanto na forma amastigota quanto na forma promastigota (CARVALHO, 2013). Além disso, os isolados de pacientes refratários ao tratamento também são resistentes a mecanismos microbicidas de macrófagos de modelo murino, bem como apresentaram resistência *in vitro* a droga de escolha e a radicais livres (SANTOS, 2013). Mais recentemente, foi observado que o efluxo de droga por meio de bombas do tipo MDR-1 não exerce influência direta no fenótipo de resistência (MAGALHÃES, 2016).

Uma vez que os parasitos resistentes à droga e oriundos de pacientes refratários ao tratamento comprovadamente modulam macrófagos de modelo murino e possuem fenótipos caracteristicamente diferenciados daqueles sensíveis a droga, torna-se relevante esclarecer quais os mecanismos envolvidos na resistência a droga como também qual o padrão de infecção desses isolados de *Leishmania (L.) infantum* na infecção neutrófilos e macrófagos com os isolados de *Leishmania (L.) infantum*, o que pode trazer novas perspectivas na busca de terapias alternativas para pacientes com baixa resposta ao tratamento e contribuir com conhecimento para entender a leishmaniose visceral.

Dessa maneira, o presente trabalho busca avaliar mecanismos associados à resistência ao antimônio em isolados de *Leishmania (Leishmania) infantum* e a interação da resistência a droga com a resposta imune. Para isso serão feitas três diferentes abordagens: avaliar mecanismos de resistência presentes nos isolados *L. (L.) infantum,* avaliar a interação desses parasitos com neutrófilos e por fim, verificar os aspectos da interação desses parasitos resistentes a droga com macrófagos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 | ASPECTOS ÉTICOS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os isolados de *Leishmania (Leishmania) infantum* utilizados foram obtidos a partir de amostras criopreservadas (estocagem a -80 °C) e armazenadas no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, oriundos de pacientes atendidos no mesmo hospital que era refratários ou responsivos ao tratamento com antimônio pentavalente.

Já as amostras de sangue foram obtidas de doadores saudáveis de área endêmica para LV sem histórico clínico da doença. O sangue foi coletado após anuência livre e esclarecida do participante sobre o projeto. As amostras de sangue foram coletadas de acordo com os padrões estabelecidos para a coleta sanguínea, seguindo as recomendações do Ministério da Saúde.

Os pacientes com LV e/ou os voluntários saudáveis fazem parte de um projeto de pesquisa maior coordenado pelo Dr. Roque Pacheco de Almeida e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HU-UFS), número do parecer 1.353.887.

2 | OS PARASITOS *L. (L.) infantum* SELECIONADOS PARA O ESTUDO

A refratariedade ao tratamento é determinada pelo Ministério da Saúde como a falha terapêutica e não obtenção de cura após a segunda série regular de tratamento com o antimonial pentavalente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Para os experimentos apenas com parasitos foram utilizados quatro isolados (dois de pacientes refratários e dois de pacientes responsivos). Para os ensaios com infecção de neutrófilos também foram utilizados quatro isolados de *L. (L.) infantum* (os mesmo que utilizados nos ensaios com promastigotas). Para os ensaios de infecção de macrófagos foram utilizados dois isolados obtidos de pacientes refratários ao tratamento e um de paciente responsivo ao tratamento (selecionados dentre os quatro isolados utilizados no estudo).

No que se refere aos parasitos utilizados, é importante descrever a situação clínica dos pacientes de onde foram obtidos os parasitos resistentes ao antimônio. A refratariedade ao tratamento com antimônio é uma característica clínica dos pacientes acometidos pela LV, enquanto a resistência ao antimônio refere-se à capacidade dos parasitos em resistir a droga. A resistência dos parasitos a droga é uma das características possíveis para o acometimento de refratariedade nos pacientes com LV.

O isolado Resistente 01 foi obtido em 2009 de um paciente com história clínica de leishmaniose visceral desde 2005. Após vários ciclos de tratamento com composto antimonial e não responder ao tratamento com anfotericina B lipossomal, o paciente alcançou cura clínica com o procedimento de esplenectomia. Já o segundo isolado resistente ao antimônio, Resistente 02, foi obtido de um paciente na sua terceira recidiva,

com uma história clínica de três anos de tratamento com antimonial. O paciente evoluiu para cura clínica com o tratamento com anfotericina B lipossomal. Diferentemente os parasitos sensíveis a droga foram obtidos de pacientes responsivos ao tratamento, os quais alcançaram a cura clínica com apenas um ciclo do tratamento, não apresentando recidiva ou recaídas.

As informações sobre os quatro isolados estão resumidas na Tabela 01.

Isolado	Ano	Circunstância da coleta	Tratamento	Seguimento Clínico	SbIII IC^{50} ± DP µM
Sensível 01	2009	Primeiro Episódio	Glucantime®	Melhora	253,3 ± 19,1
Sensível 02	2009	Primeiro Episódio	Glucantime®	Melhora	146,4 ± 24,9
Resistente 01	2009	6ª Recidiva	Glucantime®	Melhora parcial	804,2 ± 193,7*
Resistente 02	2010	3ª Recidiva	Glucantime®	Melhora parcial	752,3 ± 126,4*

*$p < 0,05$ (diferenças entre as IC50 dosisolados resistentes e as IC50 dos isolados sensíveis ao antimônio). IC50: metade da concentração inibitória máxima; DP: desvio padrão.

3 I O CULTIVO DOS PARASITOS *L. (L.) infantum*

As promastigotas foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich Co., MO, EUA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal inativado (iSBF) (Sigma-Aldrich Co., MO, EUA), L-Glutamina e 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µL/mL) (Pen/Strep) (Sigma-Aldrich Co., MO, EUA) em estufa BOD à ± 24 °C.

Semanalmente, a motilidade e morfologia das culturas foram observadas. A curva de crescimento foi realizada a partir da contagem diária em câmara de Neubauer, de cada cultura o que permitiu definir o período de crescimento logarítmico (fase log), onde há maior atividade metabólica celular, e o período estacionário (fase lag) com a maior presença de promastigotas infectivas (metacíclicas). Para os experimentos com promastigotas foram utilizados parasitos na fase log média, no terceiro dia de crescimento, e para os ensaios de infecção foram utilizados parasitos na fase estacionária, no quinto dia da curva de crescimento.

As culturas foram renovadas com a passagem de $1x10^5$ promastigotas/mL para uma nova garrafa de cultura contendo meio Schneider suplementado. Cada isolado foi mantido até a quarta passagem em cultura, evitando modificações nas características dos parasitos (JEDDI; PIARROUX; MARY, 2011). Quando necessário, isolados foram descongelados da criopreservação e colocados em cultura de crescimento após lavagem com solução salina (lavagem celular padronizada em 1620g por 10 min a 4°C).

4 | ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO TIOL E BOMBAS DE TRANSPORTE COMO MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGA

Para avaliar se os compostos contendo tiol estavam relacionados ao fenótipo de resistência a droga, foi avaliado os níveis nas promastigotas dos isolados e o efeito do bloqueio da produção de tiol na viabilidade desses parasitos.

4.1 Determinação dos níveis de tiol em promastigotas de *L. (L.) infantum*

Para avaliar os níveis de tiol nos diferentes isolados de *L. (L.) infantum* foi utilizado protocolo adaptado de Mandavilli e Janes (2010). Para isso a sonda fluorescente CellTracker™ Violet BMQC foi utilizada. Essa sonda foi criada com objetivo de observar a movimentação celular em cultura. Ela possui livre passagem pela membrana e quando internalizada se liga ao grupamento tiol, emitindo fluorescência.

Resumidamente, as promastigotas em crescimento exponencial foram lavadas para remoção dos parasitos mortos por centrifugação a baixa rotação (100g, 4°C, 10 min), onde os parasitos mortos formam pellet e os vivos permanecem no sobrenadante. Os parasitos vivos foram centrifugados formando um pellet (1620g, 4°C, 10 min) e então quantificados em câmara de Neubauer. Em seguida as promastigotas foram plaqueadas em placas de 96 poços com meio Schneider puro na presença da concentração de 1 μM da sonda fluorescente CellTracker™ Violet BMQC (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Após 20 min de incubação em estufa B.O.D. (24°C), as promastigotas foram lavadas em PBS e submetidas ao protocolo de citometria de fluxo em um citômetro BD FACSCanto II.

A estratégia de *gate* foi inicialmente baseado a partir da leitura dos parasitos em escala logarítmica e determinação da região típica dos parasitos *Leishmania* por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). Em seguida foram lidos 10 mil eventos na região determinada onde foi analisada a intensidade média de brilho (MFI) da fluorescência emitida pela sonda utilizada, no canal AmCyan.

4.2 Bloqueio da síntese de tiol e avaliação da susceptibilidade ao antimônio

Após a análise dos níveis de tiol, os parasitos foram submetidos a análise do seu perfil de resistência e susceptibilidade ao antimonial com bloqueio da síntese de tiol. Para isso, foi utilizado o protocolo adaptado de Kapoor et al (2000). Esse protocolo utiliza a L-Butionina sulfoximina (L-BSO; Sigma-Aldrich, MO., EUA), um estabelecido inibidor da via da síntese dos tióis (inibe a ação da enzima γ-glutamilcisteína sintetase).

A concentração utilizada de L-BSO foi obtida a partir da literatura e confirmada em ensaios de padronização. Foram testadas as concentrações de 3 mM e 5 mM (ambas previamente descritas). A concentração de 5 mM apresentou melhor eficiência no bloqueio da síntese de tiol, sem afetar a viabilidade dos parasitos (dados não apresentados).

Em resumo, $2x10^5$ promastigotas em fase *log* de crescimento foram adicionadas

em poços de placas de 96 poços com meio Schneider puro, em quintuplicatas, e expostas as suas respectivas concentrações inibitórias médias (IC50s) de antimônio trivalente (*Potassium antimonyl tartrate trihydrate*; Sigma-Aldric, MO., EUA) na presença ou ausência de L-BSO na concentração de 5 mM. Em seguida, as placas foram incubadas por 48h em estufa B.O.D. e então as concentrações de parasitos viáveis foram determinadas pela contagem na câmara de Neubauer, de forma cega e em quintuplicata técnica com ao menos dois experimentos independentes.

4.3 Bloqueio da síntese de tiol no tamponamento de EROS em promastigotas

A exposição ao antimonial pentavalente induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MANDAL; WYLLIE; SINGH; et al., 2007). Para avaliar esse mecanismo, foi utilizado o protocolo modificado de Fonseca-Silva et al. (2015). Em etapas, as promastigotas em fase log de crescimento foram lavadas e colocadas em placas de 96 poços na concentração de $1x10^6$/poço em meio Schneider puro. Após plaqueados, os parasitos foram expostos as suas IC50s na presença ou na ausência de L-BSO por 48h em estufa B.O.D. (24°C). Após a incubação, os parasitos foram lavados e ressuspendidos em PBS contendo 25 μM de DCFH-DA (*2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*; Sigma-Aldrich Co., MO, USA), um composto químico que é metabolizado por reações oxidativas e transformado em componente fluorescente nas células, sendo utilizado como parâmetro para medição de EROS. Com a exposição ao DCFH-DA por 30 min a 24°C, os parasitos foram lavados para remoção do meio e ressuspendido em PBS puro (Tampão Fosfato Salino), sendo submetidos a citometria de fluxo em um citômetro BD FACSCanto II. Os parasitos foram lidos e sua região foi determinada por tamanho e granulosidade, ambos em *log*, onde foram obtidos e gravados 10 mil eventos. A fluorescência do DCFH-DA foi lida no canal AlexaFluor-488.

4.4 Identificação de mecanismos de transporte

Para identificar a presença de mecanismos de transporte de efluxo foram adaptados protocolos previamente descritos com uso de marcador fluorescente Rodamina 123 e cloridrato de verapamil. Esse marcador entra de forma livre e passiva na célula, mas sua saída é dependente de mecanismo de transporte. Já o verapamil é um clássico inibidor de bombas de transporte do tipo P-gp, descritas na resistência ao antimonial. Promastigotas em cultivo na fase exponencial de crescimento, 1 x106/mL, foram lavadas com PBS frio a 1000G por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 500 μL de Schneider contendo 2,5 μM de Rodamina 123 (Molecular Probes, Thermo Fisher, EUA). As células foram incubadas por 1h em câmara escura e após esse período, as suspensões foram lavadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em 1000 μL de PBS frio. Foi feito um segundo tubo para cada isolado contendo no meio, além de Rodamina 123, o bloqueador de canal de transporte cloridrato de verapamil na concentração de 100 μM. A análise foi feita em escala

logarítmica em citômetro BD FACSCanto equipado com laser de argônio (15MW) em Alexa Fluor-488 nm por meio do software FACSDiva II e FlowJo.

Com objetivo de avaliar a atuação direta das bombas tipo P-gp na resistência in vitro ao SbIII e a capacidade de reversão dessa resistência pelo uso de bloqueador de canais, foi adotado protocolo estabelecido por Neal et al. (1989), com algumas modificações. De forma similar ao protocolo adotado para viabilidade, as promastigotas em crescimento exponencial foram lavadas e ajustadas para concentração de 1~5 x106 promastigotas/ mL. Em seguida foram expostas ao SbIII in vitro na concentração de escolha, 615 μM, com ou sem adição de cloridrato de verapamil, e diluídos em meio Schneider puro. Foram incubadas por 48h, em microplacas de 96 poços, e em estufa B.O.D. a 24 °C. Após esse período, as concentrações de promastigotas viáveis foram determinadas pela contagem na câmara de Neubauer.

4.5 Obtenção e infecção de neutrófilos humanos

O sangue humano utilizado foi obtido de diferentes doadores sadios e o protocolo utilizado para obtenção de neutrófilos humanos foi adaptado do trabalho de Afonso et al. (2008).

De forma breve, o sangue coletado foi submetido a um gradiente com o meio Polymorphprep (Axis-ShieldPoc AS, Oslo, Noruega) e centrifugado por 30 minutos a 300g a 4 °C. Após a centrifugação os neutrófilos foram coletados de sua banda específica (seguindo as instruções do fabricante que estima uma pureza média de 94%). Em seguida, os neutrófilos foram lavados três vezes com solução salina (primeiro salina na presença de água estéril, seguido apenas de salina) a 300g por 10 minutos a 4 °C. Após as lavagens, foi determinada a concentração e então as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Gibco, CA, USA) suplementado com 1% de Nutridoma-SP e penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL). Para realizar a infecção, os neutrófilos preparados foram plaqueados em placa de 96 poços numa concentração de 5 x10^5/poço.

4.6 Preparo dos isolados para infecção de neutrófilos

Promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase estacionária de crescimento foram lavadas para remoção das células mortas (primeira lavagem a 100g e segunda lavagem a 1640g) e então foram determinadas as concentrações para cada um dos isolados. Em seguida, as promastigotas foram submetidas ao protocolo de marcação com o corante fluorescente CellTracker Violet BMQC, seguindo protocolo adaptado de Dagley et al. (2015).

De forma breve, as promastigotas de cada isolado foram quantificadas e colocadas em meio Schneider contendo a sonda de marcação na concentração de 5 μM por 30 min em estufa B.O.D. (24°C). Em seguida, os parasitos foram lavados para remoção do meio com corante e então incubadas novamente agora com meio Schneider puro, por mais 30

min em estufa B.O.D. Por fim, as promastigotas foram lavadas e colocadas em meio RPMI 1640 suplementado e preparados para infecção numa concentração de $2,5x10^6$ parasitos (proporção de neutrófilos e parasitos de 1:5).

4.7 Infecção de neutrófilos e análise por citometria de fluxo

Os neutrófilos plaqueados, 5 $x10^5$/poço, foram expostos as promastigotas, $2,5x10^6$/poço, e as placas foram incubadas em estufa 37°C com 5% de CO2 por 3 horas. Ao fim do tempo de infecção as placas foram centrifugadas para remoção do sobrenadante e o pellet celular foi lavado com solução salina a 320g por 10 min a 4°C. Em seguida as células foram colocadas em meio RPMI na presença de DCFH-DA (Sigma-Aldrich Co., MO. EUA) numa concentração de 25 μM por 30 min em estufa a 37°C com 5% de CO2. Depois desse tempo, as células foram lavadas e então colocadas em PBS (tampão fosfato salino) e lidas por citometria de fluxo em um citômetro BD FACS Canto II. Após a delimitação da população de neutrófilos por tamanho e granulosidade foram utilizados dois canais: canal AmCyan, para determinação da carga parasitária, para leitura do CellTracker Violet; E o canal AlexaFluor-488 para determinação da produção de EROS pelos neutrófilos. Os dados foram analisados no software FlowJo®.

5 I OBTENÇÃO, CULTURA E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS

Para separação e diferenciação de macrófagos humanos, o sangue de doadores sadios foi coletado e fracionado utilizando gradiente de concentração Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich Co., MO., EUA). O sangue coletado e heparinizado foi diluído numa proporção 1:1 com solução salina e então colocado em um tubo de fundo cônico de 15 mL (para 3 mL de Histopaque foram adicionados 10 mL de sangue diluído). Em seguida os tubos foram centrifugados a 400g por 35 minutos a 24°C (sem freio e sem aceleração forçados). Após a centrifugação as células mononucleares do sangue periférico (PBMC, *Peripheral blood mononuclear cells,*) foram removidas de sua nuvem (faixa criada por diferença de densidade dos elementos) e lavado com solução salina a 200g por 10 min a 24°C e então novamente ressuspendido e lavado em solução salina a 400g por 10 min a 24°C. Após a segunda lavagem, o PBMC foi ressuspenso em meio RPMI 1640 (Gibco, CA, EUA) suplementado com 10% de Soro Bovino Feral inativado (iSBF) e 1% de Pen/Strep. As células foram então colocadas em placas de 24 poços previamente preparadas com lamínulas circulares estéreis, na concentração de $8x10^5$ células por poço. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO2, inicialmente por 2h e então lavadas três vezes com solução salina contendo 2% de iSBF para remoção das células não aderentes. Após as lavagens dos poços, as placas permaneceram incubadas por 5 dias para diferenciação de monócitos em macrófagos por aderência na placa, estimando-se uma concentração de $2x10^5$ macrófagos em cada poço. Após a diferenciação, os macrófagos foram infectados e

tratados.

Os parasitos cultivados e em fase estacionária da curva de crescimento foram lavados para remoção das células mortas (100g, por 10 min a 4°C) e então as promastigotas vivas foram obtidas (centrifugação a 1620g por 10 min a 4°C), diluídas em meio Schneider e contadas em câmara de Neubauer. As infecções foram realizadas na proporção de 10 parasitos para cada um macrófago ($2x10^6$ promastigotas/poço). Os parasitos foram colocados nos poços contendo macrófagos onde permaneceram por 2h de exposição em estufa a 37 °C com 5% de CO2. Após esse período, os poços foram lavados com solução salina contendo 2% de iSBF para remoção do excesso de parasitos não internalizados ou aderidos aos macrófagos e então estes foram submetidos a diferentes condições de tratamento.

Os macrófagos infectados e tratados foram então incubados em estufa a 37°C com 5% de CO2 por 24h. Ao final desse período o sobrenadante foi retirado e armazenado a -80 °C para futura análise de citocinas e as lamínulas com os macrófagos aderidos foram tratadas com álcool metílico a 100% para fixação das células, que foram coradas por meio do kit de coloração panóptico rápido (Laborclin, SP, Brasil). A partir da observação e contagem dos macrófagos em lamínulas foram determinadas a porcentagem de infecção para cada 100 macrófagos e a carga parasitária pelo número de parasitos presentes em 100 macrófagos. Para a condição de não tratamento, também foram preparadas lamínulas no tempo de 2h de exposição as promastigotas de *Leishmania (L.) infantum.* A contagem foi realizada em microscópio ótico convencional, pela contagem contínua das células nos campos observados. Feita de forma cega e em experimentos independentes.

O tempo de 24h e a concentração de parasitos (dez parasitos para cada macrófago) utilizados na infecção de macrófagos foram conseguidos após ensaios de padronização com curvas de infecção. Ambas as condições se mostraram ideias para observação dos efeitos obtidos com as diferentes condições.

5.1 Bloqueio da síntese de tiol e a infecção de macrófagos

O preparo dos macrófagos e o processo de infecção foi descrito detalhadamente no subitem 4.7. Baseado na necessidade de entender se um nível elevado de tiol nos isolados resistentes ao antimônio poderia interferir na infecção de macrófagos humanos saudáveis, foi elaborado um ensaio de infecção com isolados cultivados na presença do bloqueador da síntese de tiol, L-BSO.

De forma breve, inicialmente os parasitos foram cultivados (últimas 48h da curva de crescimento) na presença de 5 mM de L-BSO no meio cultura ou com meio livre de inibidor. Em seguida, macrófagos diferenciados a partir do PBMC de doadores saudáveis foram expostos, por 2h, a parasitos pré-tratados ou não-pré-tratados com L-BSO. Em seguida, o excesso de parasitos foi removido e foi adicionado meio RMPI suplementado. A infecção foi

avaliada no tempo de 24h para ambas as condições.

Além disso, outra abordagem de tratamento com L-BSO foi realizada, dessa vez utilizando o L-BSO como forma de tratamento de macrófagos infectados com parasitos *Leishmania*. Macrófagos infectados com parasitos resistentes ao antimônio foram tratados por 24h com L-BSO, de acordo com o protocolo descrito no tópico anterior. Como apresentado acima, foram determinadas a carga parasitária e a disseminação da infecção a partir da contagem de cem macrófagos infectados.

5.2 Infecção de macrófagos com *L. (L.) infantum* e diferentes condições de tratamento

Buscando investigar a participação da resposta imune no controle dos parasitos resistentes a droga, foram utilizadas diferentes formas de modulação da resposta imune de macrófagos visando ativar mecanismos microbicidas e pró-inflamatórios. Os tratamentos são descritos a seguir:

- Meio não tratado (meio livre de droga ou estímulo) – controle-Não tratado;
- IFNγ + LPS nas concentrações de 20 ng/mL e 100 ng/mL, respectivamente (Sigma-Aldrich Co, MO, EUA). Ambos são clássicos ativadores da resposta microbicida de macrófagos (GREEN; CRAWFORD; HOCKMEYER; et al., 1990);
- sCD40L (Forma solúvel do ligante de CD40) na concentração de 2 μg/mL (PeproTech, NJ, EUA). Molécula essencial na co-ativação da resposta imune e demonstrada com importante papel na LV (DE OLIVEIRA; VANESSA OLIVEIRA SILVA; DAMASCENA; et al., 2013; OLIVEIRA; BARRETO; BOMFIM; et al., 2015);
- Anti-IL10: na concentração de 0,5 μg/mL (R&D Systems, MN, EUA). Anticorpo de bloqueio da IL-10, uma importante interleucina reguladora, estimulada pelos parasitos *Leishmania*. (GAUTAM; KUMAR; MAURYA; et al., 2011);

Para diluição das moléculas foi utilizado meio RPMI 1640 (Gibco, CA, EUA) com 10% de iSBF e 1% de penicilina + estreptomicina.

5.3 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados

A citocina TNF-α foi quantificada por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) no sobrenadantes das culturas de infecção de macrófagos nos experimentos de inibição da síntese de tiol (Item 4.7.1). Foi utilizado um kit Human TNF-α Standard TMB ELISA Development (PeproTech, NJ, EUA). O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante e lido em um espectrofotômetro de microplaca Epoch™ (BioTek Instruments, VT, EUA).

As citocinas: GM-CSF; IFN-γ; IL-1β; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-12 p70; IL-13; IL-18; e TNF-α, foram quantificadas no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados e não infectados por até 24h e tratados com os diferentes estímulos. Foi realizado ensaio multiplex utilizando um kit ProcartaPlex™ Panel (Th1/Th2 Cytokine 11 Plex-ProcartaPlex™) (ThermoFisher Scientific, MA, EUA) e a dosagem foi determinada pelo uso do equipamento Luminex® 100/200 (Luminex Corp., TX, EUA).

5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através do software GraphPad Prism 5 (Graphpad software, CA, EUA). Os dados foram considerados estatisticamente significantes com valores de $p \leq 0,05$.

5.5 Testes estatísticos

Para os dados experimentais oriundos de ensaios com parasitos, a normalidade foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Já para os dados obtidos de ensaios com células humanas, a análise de normalidade foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os testes de ANOVA (dados paramétricos com amostras pareadas ou não pareadas), Kruskal-Wallis (dados não paramétricos e não pareados) e Friedman (dados não paramétricos e pareados) foram utilizados na comparação entre três ou mais grupos com as diferenças específicas determinadas pelos pós-testes de Tukey ou Dunn. Já para análise das diferenças entre pares de grupos, foram utilizados o Test t, para os pares com distribuição normal, e os testes de Mann-Whitney ou Wilcoxon, para os pares não normais com amostras não pareadas ou pareadas, respectivamente.

O FENÓTIPO DOS ISOLADOS RESISTENTES AO ANTIMÔNIO

Desde que os níveis aumentados de tiol contribuem para resistência ao antimônio, nós quantificamos os níveis de tiol nos parasitos resistentes e sensíveis a droga. Notavelmente, ambos os isolados resistentes exibiram níveis de tiol 1,24 vezes (24%) mais elevados quando comparados aos isolados sensíveis (Figura 01).

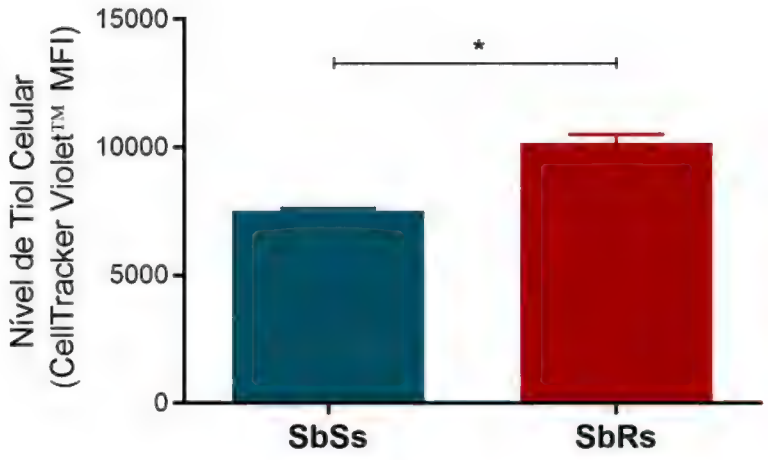

Figura 1 Níveis de tiol quantificados em promastigotas de L. (L.) infantum. As barras representam a média mais o erro padrão de cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$

Para avaliar se esses níveis elevados de tiol afetam a resistência ao antimonial, as promastigotas, em fase exponencial de crescimento, foram expostas a droga na presença ou ausência do inibidor da síntese de tiol, L-BSO. A exposição a IC50 de antimônio trivalente reduziu significativamente o número de parasitos viáveis em todos os isolados (Figura 2, $p < 0,05$). No entanto, na presença de L-BSO apenas os isolados resistentes foram significativamente menos viáveis, confirmando a relação dos altos níveis de tiol com a resistência a droga. Especificamente, o número de promastigotas nos isolados resistente foi em média 1.9 vezes menor após a exposição a SbIII + BSO quando comparado ao SbIII apenas (Figura 2).

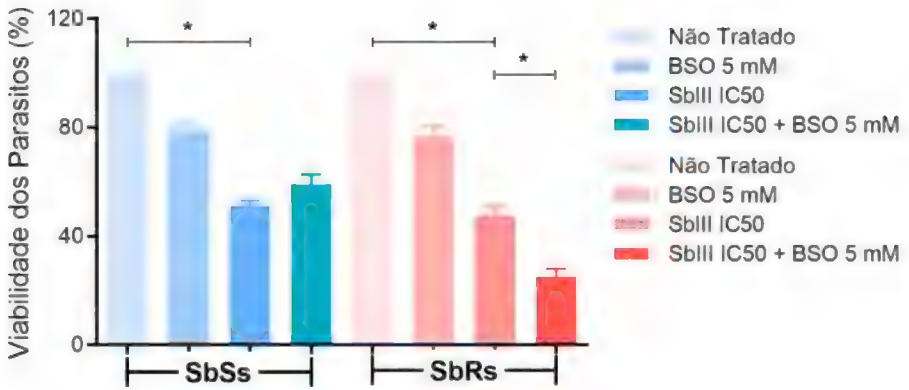

Figura 2 Viabilidade de promastigotas de L. (L.) infantum após 48h de exposição a droga (SbIII) na presença ou ausência do bloqueador da síntese de tiol (BSO). As barras representam a média mais o erro padrão de dois experimentos independentes em quintuplicata. * $p < 0,05$.

A produção de EROS foi testada em parasitos resistentes e sensíveis após tratamento com antimonial. Inicialmente foi observado que mesmo expostos a concentrações quatro vezes maiores de antimônio em sua forma ativa, os parasitos resistentes a droga produzem uma quantidade similar de EROS comparados aos parasitos sensíveis (Figura 3). Entretanto, quando realizado o bloqueio da síntese de tiol pelo tratamento com BSO, há um aumento significativo na detecção de EROS apenas nos parasitos resistentes a droga (Figura 3), confirmando o papel do mecanismo de resistência ao antimônio na neutralização de EROS e a diminuição da morte induzida pela droga.

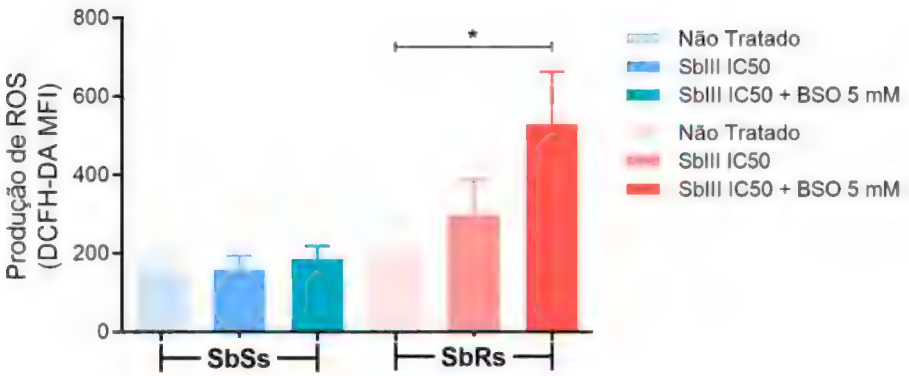

Figura 3 Detecção de EROS em promastigotas de **L. (L.) infantum** após 48h de exposição a droga (SbIII) na presença ou ausência do bloqueador da síntese de tiol (BSO). As barras representam a média mais o erro padrão de cinco experimentos independentes. * **$p < 0,05$**.

Por conseguinte, foi feita a avaliação avaliar a presença de bombas de transporte, do tipo P-gp, que estão relacionadas a uma maior resistência ao antimonial. Foram utilizados protocolos com a sonda fluorescente Rodamina 123 e o cloridrato de verapamil,

um clássico e específico bloqueador desses canais de transporte. Não houve diferença nas intensidades médias de fluorescência (MFI) entre os isolados na presença da sonda fluorescente, indicando que todos os isolados metabolizam e acumulam quantidade similar de Rodamina 123, independente do fenótipo de resistência ao SbIII (Figura 4A). Quando comparados os valores da MFI entre os próprios isolados, com e sem o uso do cloridrato de verapamil, além da comparação entre isolados de pacientes refratários e responsivos ao tratamento, também não é possível encontrar significância na diferença de MFI para cada um deles. Como descrito na literatura, a ação direta *in vitro* do cloridrato de verapamil pode ser capaz de reverter o fenótipo de resistência ao SbIII em promastigotas de *Leishmania*. No presente trabalho não foi evidenciada diferenças nas concentrações de promastigotas viáveis após exposição ao SbIII, na presença e ausência do cloridrato de verapamil, tanto para os isolados obtidos de pacientes refratários ao tratamento, quanto para os isolados de pacientes responsivos.

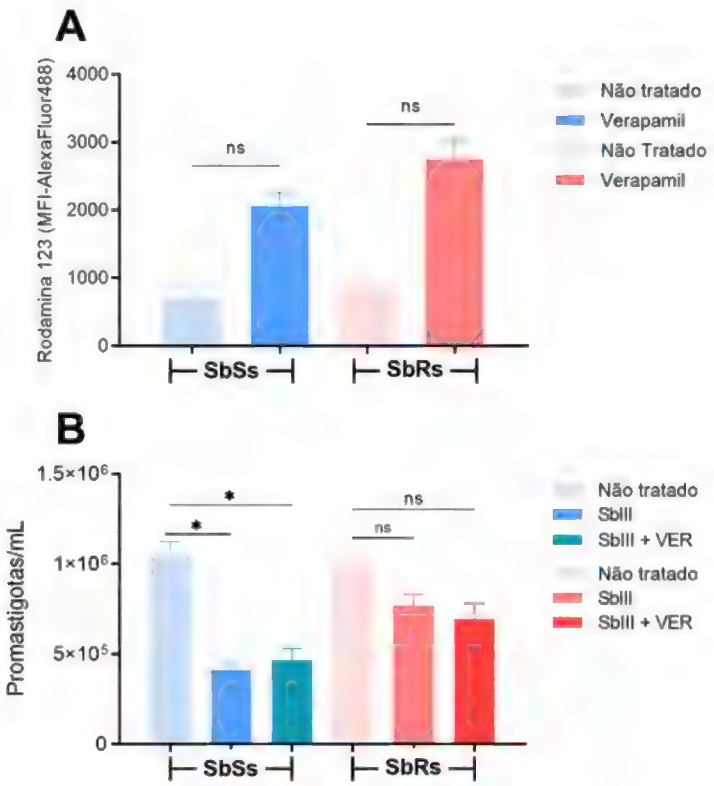

Figura 4 A. Ensaio de acúmulo da sonda Rodamina 123 na ausência e presença do cloridrato de verapamil. Os dados representam médias ± DP de três experimentos realizados de forma independente. Significância medida pelo Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. B. Ensaio de reversão do fenótipo de resistência pelo uso de cloridrato de verapamil. Os dados representam médias ± DP de dois experimentos realizados de forma independente.

O mecanismo de resistência ao antimônio baseado na remoção da droga por meio de bombas do tipo P-gp pode ser menos importante nos parasitos do presente estudo. Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, alguns estudos prévios demonstram uma importante influência das atividades de bombas P-gp no fenótipo de resistência tanto em parasitos *L. donovani* quanto em parasitos *L. infantum* (MANDAL; SARKAR; SAHA; et al., 2009; MESSARITAKIS; CHRISTODOULOU; MAZERIS; et al., 2013; RAI; GOEL; DWIVEDI; et al., 2013). Por outro lado, outros trabalho utilizando as mesmas espécies de parasitos encontraram pouca ou nenhuma influência de bombas de transporte no fenótipo de resistência a droga, como descrito neste estudo (VALIATHAN; DUBEY; MAHAJAN; et al., 2006; AUSTRUP; KARANIS, 2014).

Com os resultados apresentados, é possível observar que a resistência ao antimonial nesses isolados clínicos é primariamente baseada na alta produção e disponibilidade de tiol, molécula essencial no balanço de oxirredução dos parasitos. Essa afirmação se baseia também nos resultados já demonstrados em trabalhos anteriores com esses mesmos parasitos, onde outras características desses parasitos resistentes a droga foram estudadas (DOS SANTOS, 2011; CARVALHO, 2013; SANTOS, 2013; MAGALHÃES, 2016). Entretanto, não é possível afirmar que a resistência ao antimônio nesses isolados se baseia exclusivamente na alta produção de tióis. Os mecanismos de resistência ao antimônio têm sido demonstrados como multifatoriais, surgindo a partir de inúmeras formas de modificação do metabolismo dos parasitos (KAUR; RAJPUT, 2014). Essa característica demonstra a possibilidade de *sobreposição* de diferentes mecanismos de resistência nos mesmos parasitos.

No presente trabalho, os isolados resistentes a droga apresentaram quantidades mais elevadas de tiol, como também a inibição da síntese dessa molécula aumentou a sensibilidade dos parasitos a droga. Diversas metodologias são empregas para o estudo dos mecanismos de resistência ao antimônio. Estudos anteriores demonstram a importância dos tióis na inativação do antimônio em *L. (L.) donovani* e de *L. (L.) infantum* na presença ou ausência de outros mecanismos de resistência a droga, que podem se relacionar diretamente ao sequestro do complexo tiol-droga. Na maior parte desses estudos, foram feitas análises da expressão de RNA mensageiro de enzimas da via metabólica do tiol ou a quantificação proteica por *Western Blot* (MANDAL; WYLLIE; SINGH; et al., 2007; RAI; GOEL; DWIVEDI; et al., 2013; SINGH; CHATTERJEE; SUNDAR, 2014; GÓMEZ PÉREZ; GARCÍA-HERNANDEZ; CORPAS-LÓPEZ; et al., 2016). Alguns desses estudos utilizaram também o BSO para análise da funcionalidade dos níveis de tiol na resistência a droga, demonstrando dados similares ao encontrados no presente estudo.

Com uma metodologia diferente da utilizada no presente estudo, Moreira et al (2013) demonstraram que não houve mudança na concentração de antimônio livre em mutantes laboratoriais de *L. (L.) infantum* resistentes a droga e tratados com L-BSO. Já Goméz-

Pérez et al. (2016) demonstraram que isolados *L. (L.) infantum* obtidos de cães tratados com antimônio apresentam resistência a droga baseada na menor captação de droga pela diminuição da expressão de AQP1 e também pela inativação do antimônio por compostos tióis, avaliados pelo aumento da expressão de enzimas da via metabólica. Comparando os dados reforçando a similaridade entre os mecanismos de resistência nos parasitos do mesmo gênero, mas de espécies e regiões geográficas diferentes, o que potencializa a necessidade de busca por novas formulações universais que controlem e eliminem os parasitos resistentes.

No presente trabalho também foi observado que as promastigotas resistentes ao antimônio também são resistentes as espécies reativas de oxigênio (EROS) induzidas pela droga. É sabido que o aumento no metabolismo do tiol em isolados resistentes é potencializa a capacidade de tamponamento contra espécies reativas de oxigênio (EROS) induzidas pelo antimônio (SINGH; ALMEIDA; KOTHARI; et al., 2007). Dados anteriores utilizando esses mesmos isolados de *Leishmania (L.) infantum* demonstram que promastigotas e amastigotas apresentam resistência ao óxido nítrico (NO) (SANTOS; COSTA; BRAZ; et al., 2012; DE MOURA; SANTOS; BRAZ; et al., 2016). Adicionalmente, dados da literatura indicam que a tripanotiona, uma molécula contendo tiol, com atividade antioxidante em parasitos *Leishmania*, e similar a glutationa, molécula antioxidante essencial nos mamíferos, é capaz de sequestrar NO e manter a homeostase oxidativa (BOCEDI; DAWOOD; FABRINI; et al., 2010).

Juntos, os dados aqui apresentados sugerem que há uma resistência cruzada entre o antimonial trivalente, o SbIII, e a capacidade de tamponamento de EROS em promastigotas de *L. (L.) infantum* isoladas de pacientes refratários ao tratamento, abrindo a possibilidade desses parasitos resistentes a droga, ao utilizarem sua maquinaria de resistência, possuírem a capacidade de modular o sistema imune e sobreviver aos mecanismos microbicidas de fagócitos. Esses dados foram previamente publicados em formato de artigo científico (MAGALHÃES; BOMFIM; MOTA; et al., 2018).

A INTERAÇÃO ENTRE PARASITOS RESISTENTES A DROGA E NEUTRÓFILOS

Diante da possibilidade da interação do mecanismo de resistência a droga com os mecanismos da resposta imune, buscou-se avaliar a interação entre os parasitos e células do sistema imune.

Inicialmente, neutrófilos foram expostos a parasitos resistentes e sensíveis ao antimônio. Após a marcação dos parasitos com uma sonda fluorescente e a co-cultura com neutrófilos de doadores saudáveis por 3h (n = 4), não foram observadas diferenças na porcentagem de neutrófilos infectados (Figura 5A) ou mesmo na quantidade de brilho internalizado nessas células (MFI) o que seria proporcional a carga parasitária (Figura 5B), entre os neutrófilos infectados por parasitos resistentes ao antimônio (SbRs) os infectados com o parasito sensível a droga (SbS, parasito Sensível 01).

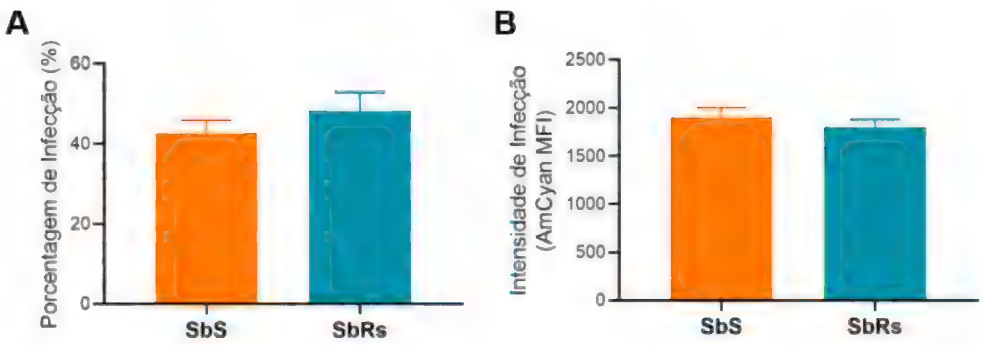

Figura 5 Infecção de neutrófilos obtidos de doadores saudáveis (n = 4) por promastigotas de *L. (L.) infantum* resistentes (SbRs) ou sensível ao antimônio (SbS) no tempo de 03h. A porcentagem de neutrófilos infectados (A) e a intensidade de infecção (MFI) (B) foram obtidos por citometria de fluxo após marcação dos parasitos com sonda fluorescente. As barras representam a média e o erro padrão de quatro experimentos independentes para ambos os grupos.

Dando continuidade, foi avaliada a produção de EROS nos neutrófilos expostos a parasitos *Leishmania*. Como observado na Figura 5, a infecção de neutrófilos obtidos de doadores saudáveis (n = 4) com as promastigotas de isolados resistentes ou sensível ao antimônio não gerou diferenças significativas na produção de EROS, seja na porcentagem de células produtoras (Figura 6A) ou na quantidade de moléculas produzidas (Figura 6B).

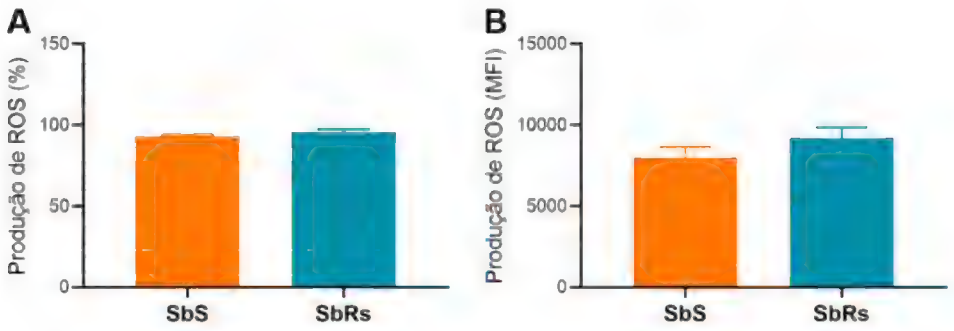

Figura 6 Produção de EROS em neutrófilos (n = 4) infectados por promastigotas de L. (L.) infantum resistentes (SbRs) ou sensível ao antimônio (SbS) no tempo de 03h. (A) Porcentagem de células produtoras de EROS. (B) Média da Intensidade de Fluorescência (MFI) da produção de EROS no neutrófilos expostos e infectados. A produção de EROS foi medida pelo uso da sonda fluorescentes, DCFH-DA (AlexaFluor-488). As barras representam a média e o erro padrão de quatro experimentos independentes.

A geração de uma resposta inflamatória por neutrófilos infectados com *Leishmania* spp. é descrita na literatura. Essas células de resposta rápida possuem alta capacidade de produção de EROS. Estudos anteriores com diferentes tipos de cepas e espécies de *Leishmania* mostram variações no perfil inflamatório de neutrófilos induzidas pelos parasitos (CARNEIRO; CONCEIÇÃO; MACEDO; et al., 2016; ROMA; MACEDO; GOES; et al., 2016; OUALHA; BARHOUMI; MARZOUKI; et al., 2019).

Com os resultados demonstrados aqui, é possível observar que a interação de neutrófilos com os diferentes isolados de *L. (L.) infantum* não leva a diferenças na porcentagem de células infectadas ou na produção de EROS. Isso evidencia que o mecanismo de resistência ao antimonial nesses isolados pode não interferir na capacidade de uma modulação direta na carga parasitária de neutrófilos infectados. É importante ressaltar ainda que a observação da carga parasitária por citometria de fluxo apesar de ser uma técnica estabelecida, pode ser limitante para observação de pequenas variações no número de parasitos internalizados. Além disso, é importante enfatizar que as condições realizadas experimentalmente no presente estudo podem ter dificultado a visualização de possíveis diferenças. O tratamento com SbIII das células infectadas ou mesmo a ativação da produção de EROS em neutrófilos poderia demonstrar a atuação do mecanismo de resistência a droga como forma de resistência aos mecanismos microbicidas e de ativação.

Apesar dos resultados encontrados, onde não foram observadas diferenças na infecção e produção de EROS, a importância da interação entre neutrófilos de parasitos *Leishmania* spp. é clara e bem estabelecida como importante fator para o desenvolvimento da doença LV (CARLSEN; LIANG; SHELITE; et al., 2015).

Recentemente, foi demonstrado que parasitos *L. (V.) panamensis* resistentes a miltefosina ou ao antimonial, mutantes obtidos artificialmente após exposição contínua as

drogas, podem modular a presença de marcadores de ativação, como o ligante de CD62, e a produção de NETs nos neutrófilos (REGLI; FERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-SALAZAR; et al., 2018). Nesse mesmo trabalho, os parasitos resistentes ao antimônio não foram capazes de estimular uma maior produção de EROS nos neutrófilos infectados. Em contramão, os parasitos resistentes a miltefosina foram capazes de alterar também a produção de EROS. Esses dados corroboram com os encontrados no presente estudo e enfatizam a necessidade de uma melhor investigação da interação dos parasitos resistentes ao antimônio e os neutrófilos.

Dessa forma, novos experimentos são necessários para melhor explorar a interação entre os neutrófilos e os isolados de *L. (L.) infantum* resistentes a droga, como a quantificação da produção de NETs pelos neutrófilos. Também a investigação da ativação dessas células observada pela mudança nos marcadores de ativação.

A RELAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A DROGA COM A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS

Continuando a explorar a interação entre os isolados resistentes ao antimônio e as células do sistema imune, o próximo passo foi avaliar a infecção de macrófagos com os isolados resistentes ao antimônio, já que os macrófagos são importantes células de defesa e alvo do parasitismo do gênero *Leishmania*, com papel essencial na produção de moléculas microbicidas, como EROS e NO (SHARMA; SINGH, 2009; LIU; UZONNA, 2012; ROCI; FASEL, 2018). Os resultados encontrados e discutidos a seguir foram publicados em um artigo científico (MAGALHÃES; BOMFIM; SANTOS; et al., 2021).

O bloqueio da síntese de tiol antes da infecção foi capaz de diminuir significativamente a disseminação de parasitos e carga parasitária nas primeiras 24h de infecção, o que não foi observado nos parasitos não-pré-tratados com L-BSO antes da infecção. O número de macrófagos infectados é 2,4 vezes menor em 24h quando os parasitos são pré-tratados com L-BSO, enquanto nos macrófagos infectados com parasitos não-pré-tratados há uma redução de 1,6 vezes. É possível observar ainda que o parasitismo observado nas duas primeiras horas de infecção não sofre influência do pré-tratamento com o L-BSO. Além disso, o pré-tratamento dos parasitos resistentes ao antimônio com L-BSO foi capaz de aumentar, 2,0 vezes mais ($p = 0,05$), a quantidade de TNF-α no sobrenadante de macrófagos infectados por 24h.

Em seguida, os macrófagos infectados foram tratados com L-BSO. O uso de L-BSO durante 24h de tratamento em macrófagos infectados com parasitos resistentes ao antimônio foi capaz de reduzir em 2,1 vezes a disseminação de parasitos e a carga parasitária comparado ao tempo de 2h. Complementar a isso, com o tratamento por L-BSO os macrófagos infectados com parasitos resistentes a droga produziram 2,5 vezes mais TNF-α em 24h após a infecção dos macrófagos com parasitos sem o bloqueio da síntese de tiol.

Os resultados observados demonstram que a maquinaria de resistência a droga presente nos parasitos resistentes ao antimônio exerce influência na infecção de macrófagos humanos. O bloqueio da síntese aumentada de tiol nos parasitos resistentes ao antimônio atuou reduzindo significativamente a porcentagem de infecção e a carga parasitária nas primeiras 24h. O bloqueio da síntese de compostos contendo tiol diretamente nos macrófagos infectados também diminui significativamente o parasitismo. Esse tratamento pode estar atuando diretamente na síntese de tiol dos macrófagos, mas também poderia ser capaz de atuar nas amastigotas internalizadas. Complementar a isso, o bloqueio da síntese de tiol não interferiu na entrada dos parasitos nos macrófagos (tempo de 2h). Os resultados sugerem que o mecanismo de resistência ao antimônio não está ligado diretamente a capacidade invasiva dos parasitos, mas se relaciona a competência de sobreviver quando internalizados nos macrófagos. Além disso, os dados sugerem que a maquinaria de síntese

do tiol, nos parasitos ou nos macrófagos, poderia ser utilizada para sobrevivência dos parasitos internalizados. Além da interferência no parasitismo de macrófagos, os dados demonstram uma maior produção de TNF-α com a inibição da síntese de tiol em ambas as condições, inibição prévia nos parasitos ou nas células infectadas. Esse achado sugere que o tiol presente nas células poderia interferir na síntese de um perfil pró-inflamatório nos macrófagos infectados.

Compreendendo o papel do tiol nos parasitos, a tripanotiona, principal molécula antioxidante que contém tiol em tripanossomatídeos, tem sido demonstrada como essencial à sobrevivência dos parasitos *Leishmania* spp., especialmente em seu papel no balanço de oxirredução. Além da participação direta do tiol na resistência do parasito ao antimônio, é sabido que o sistema de oxirredução do macrófago, especialmente o balanço entre as vias da arginase (ARG) e do óxido nítrico sintase (NOS), pode ser subvertido pelos parasitos *Leishmania*. A via da arginase é produtora de poliaminas e induzida pelos parasitos internalizados, levando a sobrevivência e aumento no parasitismo, enquanto a capacidade dos macrófagos infectados em induzir a via da NOS (produtora de moléculas microbicidas), leva a eliminação das amastigotas de *Leishmania* spp. (MUXEL; AOKI; FERNANDES; et al., 2018). Os parasitos *Leishmania* spp. na forma intracelular podem modular macrófagos a produzir poliaminas essenciais e enviar essas moléculas para o vacúolo parasitóforo, levando a sobrevivência dos parasitos e ignorando a arginase própria dos protozoários, utilizando apenas as dos macrófagos (BOITZ; GILROY; OLENYIK; et al., 2017).

Curiosamente, além do conhecimento obtido a partir da interação de macrófagos com parasitos *Leishmania*, tem sido demonstrado que compostos antioxidantes contendo tiol, como a glutationa, podem modular diretamente a produção de um perfil inflamatório em macrófagos. Trabalhos previamente publicados, demonstram que o aumento na quantidade de tiol nos macrófagos está relacionado diretamente à sua capacidade de produzir citocinas e ativar vias da resposta inflamatória, produtora de radicais livres. Maiores quantidades de tiol levam a diminuição da produção de interleucinas Th1, ao passo que a inibição da síntese de tiol ou o sequestro de moléculas antioxidantes é capaz de aumentar significativamente a produção dessas citocinas (GOSSET; WALLAERT; TONNEL; et al., 1999; HADDAD; SAFIEH-GARABEDIAN; SAADÉ; et al., 2001; MAZZEO; SACCO; DI LUCIA; et al., 2002). Apesar disso, pouco se sabe sobre o mecanismo efetor que leva a diminuição do perfil inflamatório de macrófagos na presença de moléculas contendo tiol. Estudos demonstram que o as moléculas contendo tiol podem atuar diretamente interferindo na formação de heterodímeros de IL-12, como também poderiam atuar inibindo a ativação do NF-κB, importante fator de transcrição da via pro-inflamatória e ainda desempenhar papel de regulador da resposta imune (MAZZEO; SACCO; DI LUCIA; et al., 2002; COPPO; GHEZZI, 2011).

No presente estudo, é possível observar que macrófagos infectados com parasitos

resistentes ao antimônio pré-tratados com inibidor da síntese de tiol ou macrófagos infectados e tratados com o mesmo inibidor aumentam significativamente a produção de TNF-α, corroborando com a ideia da interferência direta do tiol no perfil inflamatório que se relacionou ao controle dos parasitos nos macrófagos infectados.

Dessa forma, os resultados demonstrados no presente trabalho indicam que altos níveis de tiol nos isolados de *L. (L.) infantum* resistentes ao antimônio podem atuar na capacidade inflamatória e microbicida de macrófagos, tornando-os permissivos a um maior parasitismo, já que a inibição da síntese de tiol nos parasitos foi capaz de potencializar a redução no número de macrófagos infectados, da carga parasitária e aumentar a produção de TNF-α.

Além disso, a presença de níveis aumentados de tiol nos parasitos pode estar relacionada a modulação do metabolismo da L-arginina em macrófagos. Uma vez que a inibição da síntese de tiol nos macrófagos infectados também foi capaz de reduzir significativamente o parasitismo e aumentar a produção de molécula inflamatória, há um indicativo que os parasitos atuam num desbalanço entre as vias ARG e NOS, que poderia induzir a produção de antioxidantes e poliaminas essenciais aos parasitos.

Sabendo que o mecanismo de resistência ao antimônio em parasitos resistentes se relaciona ao parasitismo na infecção de macrófagos, o próximo passo foi analisar se as diferentes formas de ativação dos macrófagos poderiam contribuir no controle desses parasitos.

Os resultados observados demonstraram a capacidade da resposta imune em controlar a disseminação dos parasitos resistentes a droga. Foi observado um padrão da não redução no número de macrófagos infectados comparando os tempos de 2h e 24h de infecção, foi observado apenas nas células infectadas com isolados resistentes ao antimônio, enquanto aquelas infectadas pelo isolado sensível a droga apresentaram redução significativa do número de macrófagos contendo parasitos em 24h. Essa disseminação da infecção, capacidade desses parasitos resistentes ao antimônio de sobreviver em um número maior de células por mais tempo, mesmo que sejam controlados com 48h ou mais de infecção, pode implicar numa capacidade de evasão da resposta imune.

É importante ressaltar que diferente do que foi observado nos experimentos anteriores, os achados atuais mostram um controle natural da carga parasitária dos macrófagos infectados com parasitos resistentes a droga nas primeiras 24h. Essa contradição de resultados pode ser devido a limitações experimentais, variações naturais entre as células dos indivíduos saudáveis utilizadas nos experimentos. Assim como a controle natural do isolado sensível a droga, tanto para a carga parasitária quanto para disseminação dos parasitos. Isso reforça a capacidade de pessoas em controlar a infecção por parasitos *Leishmania* naturalmente, diferente de modelos murinos utilizados para LV (PÉREZ-CABEZAS; CECÍLIO; GASPAR; et al., 2019).

Além das primeiras horas de interação dos parasitos com as células do sistema imune serem essenciais no estabelecimento da doença (LIU; UZONNA, 2012), é sabido que há uma dificuldade para cura clínica estéril de pacientes acometidos por diferentes formas de leishmaniose e isso pode implicar em uma imunidade protetora ou mesmo, durante um quadro de baixa dos sistema imune, em um situação de volta da doença (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019). Dessa forma, o fator dos parasitos resistentes ao antimônio permanecerem disseminados em mais células por mais tempo e serem capazes de resistir a dosagens maiores da droga, pode fazer com que haja mais dificuldade na eliminação desses parasitos e uma possibilidade nas chances de recidiva do quadro clínico.

O uso dos reguladores da resposta imune, seja pela ativação da resposta microbicida, com IFN-γ+LPS ou rsCD40L, ou pelo bloqueio da resposta regulatória, com Anti-IL-10, demonstra a importância da resposta imune no controle efetivo dos parasitos resistentes ao antimônio. A ativação de macrófagos com IFN-γ+LPS é sabidamente conhecida por estimular um perfil pró-inflamatório, Th1, levando a eliminação de parasitos pela produção e liberação de NO (MOSSER; EDWARDS, 2008). Além disso, a forma solúvel do CD40L foi previamente demonstrada como um importante biomarcador na evolução e melhora clínica de pacientes com leishmaniose visceral e associada a redução da carga parasitária em macrófagos infectados, mostrando papel de ativação de mecanismos microbicidas (DE OLIVEIRA; VANESSA OLIVEIRA SILVA; DAMASCENA; et al., 2013; OLIVEIRA; BARRETO; BOMFIM; et al., 2015). Finalmente, a IL-10 tem sido extensivamente demonstrada como citocina crucial na resposta imune desencadeada na leishmaniose visceral, sempre relacionada a regulação da resposta imune e controlando a ação de mecanismos microbicidas (CALDAS; FAVALI; AQUINO; et al., 2005; NYLÉN; SACKS, 2007).

A partir de dados do presente estudo, a ativação da resposta imune de macrófagos infectados com parasitos resistentes e sensível ao antimônio, demonstrou um perfil pró-inflamatório classicamente descrito como resolutivo para infecção com parasitos *Leishmania* spp., especialmente na condição de ativação e potencialização da resposta imune e microbicida, IFN-γ+LPS. Como visto anteriormente, foram observados aumento nos níveis de TNF-α, IL-6, GM-CSF, IL-1β e IL-12p70, previamente demonstradas com importantes papeis na leishmaniose visceral, como na ativação de mecanismos efetores nas células, no recrutamento e ativação de células especializadas na eliminação dos parasitos e na ativação da via do inflamassoma, um complexo proteico celular capaz de controlar a infecção dos parasitos pela ativação de mecanismos inflamatórios (LIEW; PARKINSON; MILLOTT; et al., 1990; BADARÓ; NASCIMENTO; CARVALHO; et al., 1994; MURRAY; CERVIA; HARIPRASHAD; et al., 1995; RIBEIRO-DE-JESUS; ALMEIDA; LESSA; et al., 1998; BACELLAR; D'OLIVEIRA; JERÔNIMO; et al., 2000; LIMA-JUNIOR; COSTA; CARREGARO; et al., 2013).

Em adição aos resultados anteriores, o tratamento com rsCD40L também induziu

uma produção diferenciada de citocinas. Foi observado um aumento significativo ou visual nos níveis de IL-6 nos macrófagos infectados tanto pelo isolado sensível quanto pelos isolados resistentes, mostrando a capacidade dessa molécula de co-ativação em contribuir com o processo inflamatório associado a eliminação de parasitos. Trabalhos anteriores demonstraram que o uso de CD40L solúvel é capaz de estimular a produção de citocinas da família da IL-12 e essa produção foi associada ao controle dos parasitos (DE OLIVEIRA; VANESSA OLIVEIRA SILVA; DAMASCENA; et al., 2013; OLIVEIRA; BARRETO; BOMFIM; et al., 2015).

A IL-12 tem sido demonstrada como essencial na manutenção da resistência a infecção por parasitos *Leishmania* pela indução do perfil Th1 de resposta imune (PARK; HONDOWICZ; KOPF; et al., 2002), assim como desempenhando papel importante no controle de parasitos *Leishmania* em períodos mais tardios da infecção (TORRENTERA; LAMAN; VAN MEURS; et al., 2002). O aumento dos níveis de IL-12p70 apenas nos macrófagos infectados com o parasito sensível tratados com rsCD40L, apesar do controle da disseminação dos parasitos resistentes a droga, indicam que o controle da disseminação não depende de um mecanismo único, baseado apenas na produção de IL-12, mas também em outras citocinas que podem levar a um aumento na capacidade microbicida dos macrófagos.

Dados previamente publicados com parasitos resistentes ao antimônio, demonstram que parasitos *L. (L.) donovani* resistentes a droga induzem uma produção de IL-12 nas 2h iniciais de infecção e depois são capazes de inativar essa produção por meio de miRNAs e levar ao aumento na síntese de IL-10 com 24h de infecção (MUKHERJEE; PAUL; MUKHERJEE; et al., 2015). Os dados obtidos no presente estudo demonstram que o uso de anticorpo antagonista de IL-10 potencializa o controle da infecção de parasitos resistentes ao antimônio, mas não altera a produção e liberação de qualquer citocina dosada, indicando que a IL-10 esteja sendo produzida e regulando a atuação dos macrófagos no controle da disseminação dos parasitos.

Curiosamente, dados anteriores com os mesmos parasitos utilizados no presente estudo, mostram que a infecção de macrófagos de linhagem murina não foi controlada mesmo com o tempo tardio de 72h e que a ativação com IFN-γ +LPS aumentou somente a quantidade de IL-1 produzida no sobrenadante (DE MOURA; SANTOS; BRAZ; et al., 2016). IL-1 também foi observada na ativação dos macrófagos com IFN-γ+LPS, mas acompanhada de outras citocinas pró-inflamatórias. Além disso, as diferenças observadas nos estudos podem ser compreendidas em parte pela dificuldade de transportar a infecção da leishmaniose visceral para modelos murinos e consequentemente a infecção de suas células, reforçando a importância de estudos com células humanas para compreender melhor os mecanismos da resposta imune frente a infecções.

Ao se observar os resultados obtidos com a ativação da resposta imune e mecanismos

microbicidas, principalmente do perfil de citocinas aumentadas, reforça-se a importância da modulação da resposta de macrófagos no controle dos parasitos. Os resultados anteriores do trabalho demonstram que o tratamento com L-BSO em macrófagos infectados com parasitos resistentes ao antimônio ou a inibição da síntese de tiol nos parasitos antes da infecção foram capazes de aumentar a produção de TNF-α junto a diminuição do parasitismo nas células infectadas. Somados os resultados encontrados nos dois experimentos, pode-se sugerir que o manejo eficiente da resposta imune de células infectadas pode controlar o efeito da regulação da resposta imune induzida pelos parasitos resistentes ao antimônio.

A presença aumentada de TNF-α tanto nos experimentos com a inibição da síntese de tiol, como na ativação da resposta imune, demonstram pela primeira vez na literatura, que o nível aumentado de tiol em parasitos *Leishmania* resistentes ao antimônio modula diretamente a capacidade inflamatória e microbicida de macrófagos. Esse fato se torna ainda mais importante principalmente com a ascensão de casos de formas atípicas de leishmaniose relacionadas ao uso de moduladores do TNF-α em pacientes na Europa, onde a descontinuação do uso de bloqueador de TNF-α foi associado a melhora clínica e eficácia do tratamento para leishmaniose (BOSCH-NICOLAU; UBALS; SALVADOR; et al., 2019).

Contudo, é preciso salientar que a presença aumentada de IL-6 em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias podem estar associadas a maior gravidade da leishmaniose visceral *in vivo.* Estudos recentes demonstram que o perfil inflamatório classicamente relacionado ao controle de parasitos *Leishmania* em experimentos *in vitro,* pode ser prejudicial à saúde do paciente, já que a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias pode não estar associada diretamente a produção de moléculas microbicidas e ao controle direto dos parasitos, mas sim causando um aumento dos sinais e sintomas, prejudicando a melhora clínica dos pacientes, evidenciando o cuidado entre a translação de resultados experimentais para a prática clínica, mas também reforçando o papel da interação da resposta imune do paciente com o controle eficaz dos parasitos e da doença (DOS SANTOS; DE OLIVEIRA; SANTOS; et al., 2016; ARAÚJO-SANTOS; ANDRADE; GIL-SANTANA; et al., 2017).

Com os resultados apresentados aqui, podemos compreender que altos níveis de tiol como mecanismo de resistência ao antimônio podem interferir diretamente na capacidade de infecção dos parasitos em macrófagos humanos, essencialmente na capacidade de disseminar essa infecção nas primeiras 24h, não estando diretamente ligado a internalização dos parasitos nos macrófagos. Além disso, a ativação da resposta imune ou bloqueio da regulação nos macrófagos infectados estão associados ao controle da disseminação junto a produção de citocinas pró-inflamatórias. A ação da IL-10 induzida pelos parasitos pode regular a atividade imune dos macrófagos e levar a uma produção ineficiente de moléculas microbicidas, como EROS e NO. Enquanto a ativação eficaz de mecanismos microbicidas

ou inibição da regulação da resposta de macrófagos pode desencadear um processo inflamatório benéfico associado a morte dos parasitos e ao controle da disseminação. Os achados da infecção de macrófagos estão resumidos no esquema apresentado a seguir.

Juntos, esses resultados enfatizam a necessidade de melhor compreender a interação entre os mecanismos de resistência a droga e as células de defesa do organismo hospedeiro, assim como compreender a resposta imune desencadeada, especialmente pela importância das horas iniciais da interação das células de defesa com os parasitos, como do papel da persistência de parasitos após a cura clínica (LIU; UZONNA, 2012; DE FREITAS; LEORATTI; FREIRE-DE-LIMA; et al., 2016).

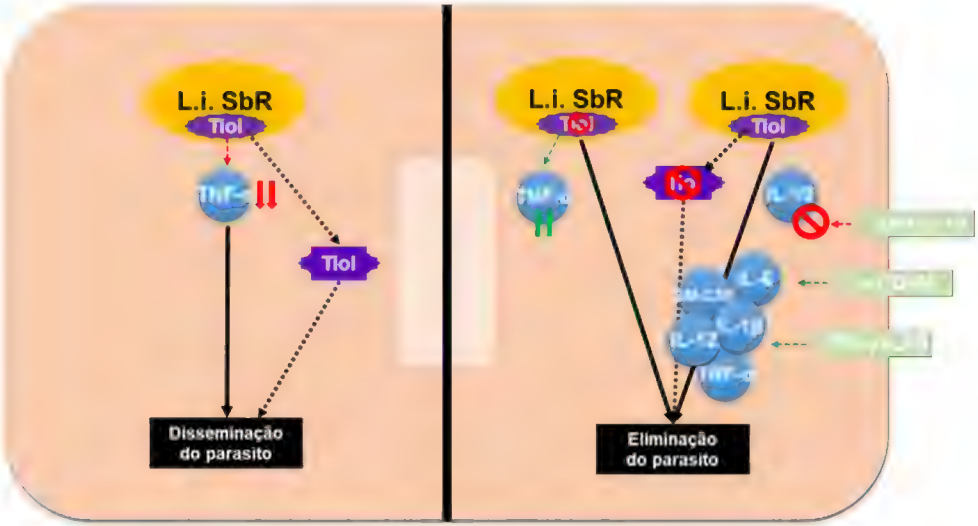

Figura 7 Ilustração esquemática demonstra os achados encontrados no presente trabalhos. Os dados sugerem que há uma relação entre o mecanismo de resistência ao antimônio, altos níveis de tiol, e a capacidade de parasitismo em macrófagos humanos. Os elevados níveis de tiol nos parasitos resistentes poderiam induzir a síntese de moléculas antioxidante nos macrófagos e levar a diminuição do perfil anti-inflamatório nessas células. Enquanto o bloqueio da síntese de tiol nos parasitos ou nos macrófagos infectados, assim como uma modulação positiva da resposta imune dos macrófagos, levam a um controle do parasitismo e a indução de um perfil pró-inflamatório, classicamente associado a produção de moléculas microbicidas capazes de controlar a infecção dos parasitos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O aumento na síntese de tiol nos parasitos, molécula essencial para formação de antioxidantes, é importante para o estabelecimento de resistência à forma ativa do antimônio.

- Os níveis elevados de tiol nos parasitos resistentes ao antimônio servem como mecanismo de resistência contra moléculas microbicidas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio.

- A interação dos parasitos resistentes com neutrófilos não afeta diretamente a intensidade de parasitismo, a quantidade de células infectadas ou a produção de espécies reativas de oxigênio, necessitando de uma melhor investigação para esclarecer se há ou não interferência do mecanismo de resistência à droga na infecção dessas células.

- A expressão aumentada de tiol nos isolados resistentes ao antimônio é capaz de modular a resposta de macrófagos e induzir a sobrevivência dos parasitos. O bloqueio da síntese de tiol nos parasitos ou nas células infectadas potencializa o controle da infecção e leva a produção de citocina inflamatória.

- A ativação da resposta microbicida de macrófagos está associada a um controle eficaz da disseminação dos parasitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A inativação da IL-10 induzida pela infecção de macrófagos com isolados resistentes ao antimônio está ligada ao controle da resposta microbicida estimulada de forma simultânea, que somada a capacidade de resistência desses parasitos aos mecanismos efetores microbicidas dos macrófagos, pode potencializar a disseminação e a dificuldade de um *clearance* eficaz dos parasitos.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L.; BORGES, V. M.; CRUZ, H.; et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with Leishmania amazonensis. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 2, p. 389–396, 2008.

AIT-OUDHIA, K.; GAZANION, E.; OURY, B.; et al. The fitness of antimony-resistant Leishmania parasites: Lessons from the field. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 141–142, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.003>.

AÏT-OUDHIA, K.; GAZANION, E.; VERGNES, B.; et al. Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1225–32, nov. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21800124>. Acesso em: 16 fev. 2016.

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, mar. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302018000300281&lng=en&tlng=en>.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current Opinion in Microbiology**, v. 26, p. 32–40, ago. 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527415000508>.

ARAÚJO-SANTOS, T.; ANDRADE, B. B.; GIL-SANTANA, L.; et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

AUSTRUP, J.; KARANIS, P. Frequency of MDR1-related p-gp overexpression in Greek Leishmania isolates. **Parasitology research**, v. 113, n. 3, p. 1225–32, mar. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504599>. Acesso em: 4 set. 2014.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A.; JERÔNIMO, S.; et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228–1231, 2000.

BADARÓ, R.; NASCIMENTO, C.; CARVALHO, J. S.; et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in combination with pentavalent antimony for the treatment of visceral leishmaniasis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, n. 2 Supplement, p. 23–28, 1994.

BOCEDI, A.; DAWOOD, K. F.; FABRINI, R.; et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 4, p. 1035–42, 1 abr. 2010. Disponível em: <http://www.fasebj.org/cgi/content/long/24/4/1035>. Acesso em: 23 fev. 2016.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DÖRING, R.; et al. Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 2000. Disponível em: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.191.12.2121>.

BOITZ, J. M.; GILROY, C. A.; OLENYIK, T. D.; et al. Arginase Is Essential for Survival of Leishmania donovani Promastigotes but Not Intracellular Amastigotes. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 1, p. e00554-16, jan. 2017. Disponível em: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00554-16>.

BOMFIM, L. G. S.; MAGALHÃES, L. S.; SANTOS-FILHO, M. A. A.; et al. Leishmania infantum Induces the Release of sTREM-1 in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. November, p. 1–8, 2017.

BOSCH-NICOLAU, P.; UBALS, M.; SALVADOR, F.; et al. Leishmaniasis and tumor necrosis factor alpha antagonists in the Mediterranean basin. A switch in clinical expression. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1–16, 2019.

BROCHU, C.; WANG, J.; ROY, G.; et al. Antimony uptake systems in the protozoan parasite Leishmania and accumulation differences in antimony-resistant parasites. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3073–9, out. 2003. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

BROTHERTON, M.-C.; BOURASSA, S.; LEPROHON, P.; et al. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant Leishmania infantum mutant. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e81899, jan. 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3842243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 19 ago. 2014.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; et al. Balance of IL-10 and interferon-γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 1–9, 2005.

CAMPOS, R.; SANTOS, M.; TUNON, G.; et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v. 12, n. 1, 11 maio 2017.

CARLSEN, E. D.; LIANG, Y.; SHELITE, T. R.; et al. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, 30 jun. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126690>. Acesso em: 14 set. 2015.

CARNEIRO, P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of Leishmania braziliensis by Monocytes from Patients with Cutaneous PubMed Commons. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. 1–2, 2016.

CARVALHO, S. S. de. **Avaliação da atividade leishmanicida de espécies reativas do oxigênio para Leishmania Leishmania chagasi**. 2013. Universidade Federal de Sergipe, 2013.

CATTA-PRETA, C. M. C.; MOTTRAM, J. C. Drug candidate and target for leishmaniasis. **Nature**, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/d41586-018-05765-y>.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M. da; FERREIRA, L. C.; et al. Leishmaniose Visceral Americana: (Relatorio dos trabalhos realisados pela commissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, n. 1, p. 89–229, 1938. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761938000100010&lng=pt&tlng=pt>.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 5, n. 1740– 1534 (Electronic), p. 873–882, 2007. Disponível em: <c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CParasitologie-PDFs%5CParasit-2007%5CChappuis et al.-Visceral leishmaniasis- what are the needs for diagnosis treatment and control.pdf>.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in Leishmania: From arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 269–285, 2011.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. Leishmania Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–14, 2019.

COPPO, L.; GHEZZI, P. Thiol regulation of pro-inflammatory cytokines and innate immunity: Protein S-thiolation as a novel molecular mechanism. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1268–1272, 2011.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1478–83, out. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933306>.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–26, jan. 2006. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1360270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DAGLEY, M. J.; SAUNDERS, E. C.; SIMPSON, K. J.; et al. High-Content Assay for Measuring Intracellular Growth of Leishmania in Human Macrophages. **Assay and drug development technologies**, v. 13, n. 7, p. 389–401, 2015. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/full/10.1089/adt.2015.652>.

DANTAS-TORRES, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117–118, fev. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762006000100024&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 13 ago. 2015.

DE AZEVEDO, A. F. **Perfis de ácidos graxos em isolados de Leishmania spp. com resistência natural ao óxido nítrico e ao trivalente**. 2013. Univerisdade Federal de Sergipe, 2013.

DE FREITAS, E. O.; LEORATTI, F. M. de S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; et al. The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. April, p. 1–7, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00153>.

DE MOURA, T. R.; SANTOS, M. L. B.; BRAZ, J. M.; et al. Cross-resistance of Leishmania infantum isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 713–721, 19 fev. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4793-4>.

DE OLIVEIRA, F. A.; VANESSA OLIVEIRA SILVA, C.; DAMASCENA, N. P.; et al. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 331, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3733913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 9, p. 822–838, 2008.

DEY, R.; JOSHI, A. B.; OLIVEIRA, F.; et al. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1β. **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134- 143.e6, 2018.

DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRASCASA, M.; et al. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 4, p. 451–9, 2002. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193616&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

DOS REIS, L. L.; BALIEIRO, A. A. da S.; FONSECA, F. R.; et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.

DOS SANTOS FERREIRA, C.; SILVEIRA MARTINS, P.; DEMICHELI, C.; et al. Thiol-Induced Reduction of Antimony(V) into Antimony(III): A Comparative Study with Trypanothione, Cysteinyl-Glycine, Cysteine and Glutathione. **BioMetals**, v. 16, n. 3, p. 441–446, 2003. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1022823605068>. Acesso em: 19 ago. 2015.

DOS SANTOS, P. L. **Avaliação da viabilidade de isolados de Leishmania Leishmania chagasi ao óxido nítrico e associação com a infectividade e a nitração proteica**. 2011. Universidade Federal de Sergipe, 2011.

DOS SANTOS, P. L.; DE OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. L. B.; et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, 2016. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004375>.

DU, R.; HOTEZ, P. J.; AL-SALEM, W.; et al. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. In press, p. 1–11, 2016.

ESPINOSA, O. A.; SERRANO, M. G.; CAMARGO, E. P.; et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430–442, 15 abr. 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182016002092>.

FONSECA-SILVA, F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; et al. Effect of Apigenin on Leishmania amazonensis Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 880–884, 2015.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/7/2317>.

FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 119–132, 25 jan. 2014. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/49/5/1988.short>. Acesso em: 16 set. 2014.

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GHOBAKHLOO, N.; MOTAZEDIAN, M. H.; NADERI, S.; et al. Isolation of Crithidia spp. from lesions of immunocompetent patients with suspected cutaneous leishmaniasis in Iran. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 1, p. 116–126, 2019.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GÓMEZ PÉREZ, V.; GARCÍA-HERNANDEZ, R.; CORPAS-LÓPEZ, V.; et al. Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of Leishmania infantum. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 2, p. 133–139, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211320716300070>.

GOSSET, P.; WALLAERT, B.; TONNEL, A. B.; et al. Thiol regulation of the production of TNF-α, IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 14, n. 1, p. 98–105, 1999.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; et al. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 12, p. 4290–7, 15 dez. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124240>.

GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; FROMENT, G. S.; et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, set. 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12484>.

HADDAD, J. J. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; SAADÉ, N. E.; et al. Thiol regulation of pro-inflammatory cytokines reveals a novel immunopharmacological potential of glutathione in the alveolar epithelium. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 3, p. 996–1005, 2001.

IANTORNO, S. A.; DURRANT, C.; KHAN, A.; et al. Gene Expression in Leishmania Is Regulated Predominantly by Gene Dosage. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01393-17, 2017. Disponível em: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01393-17>.

JARIYAPAN, N.; DAROONTUM, T.; JAIWONG, K.; et al. Leishmania (Mundinia) orientalis n. sp. (Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 3–11, 2018.

JEDDI, F.; MARY, C.; AOUN, K.; et al. Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of leishmania species from the Western mediterranean area. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4866–74, ago. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24913173>. Acesso em: 27 ago. 2014.

JEDDI, F.; PIARROUX, R.; MARY, C. Antimony resistance in leishmania, focusing on experimental research. **Journal of tropical medicine**, v. 2011, p. 15, jan. 2011. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jtm/aip/695382/>. Acesso em: 15 set. 2014.

JOHN, B.; HUNTER, C. a. IMMUNOLOGY: Neutrophil Soldiers or Trojan Horses? **Science**, v. 321, n. 5891, p. 917–918, 2008. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1162914>.

KALANTARI, M.; MOTAZEDIAN, M.; ASGARI, Q.; et al. Co-detection and isolation of Leishmania and Crithidia among naturally infected Tatera indica (Rodentia: Muridae) in Fars province, southern Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 8, n. 5, p. 279, 2018.

KAPOOR, P.; SACHDEV, M.; MADHUBALA, R. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 6, p. 438–442, 2000.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin b, and pentamidine resistance in leishmania. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>.

KOSTYGOV, A. Y.; YURCHENKO, V. Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae). **Folia Parasitologica**, v. 64, p. 5–9, 2017.

KRAEVA, N.; BUTENKO, A.; HLAVÁČOVÁ, J.; et al. Leptomonas seymouri: Adaptations to the Dixenous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with Leishmania donovani. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 1–23, 2015.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; INHOFF, O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. **Parasitology Research**, v. 90, n. SUPPL. 2, p. 77–85, 2003.

KUMAR, A. **Leishmania and Leishmaniasis**. New York, NY: Springer New York, 2013. v. 3

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. AUG, p. 251, jan. 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3418610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 3 out. 2014.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, jun. 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v1n2/pt_v1n2a02.pdf>. Acesso em: 7 out. 2014.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, dez. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762005000800001&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 20 jul. 2015.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. In: **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

LÉGARÉ, D.; RICHARD, D.; MUKHOPADHYAY, R.; et al. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 28, p. 26301–7, 13 jul. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306588>. Acesso em: 14 set. 2014.

LEPROHON, P.; FERNANDEZ-PRADA, C.; GAZANION, ??lodie; et al. Drug resistance analysis by next generation sequencing in Leishmania. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 1, p. 26–35, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.09.005>.

LIEW, F. Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; et al. Tumour necrosis factor (TNFα) in leishmaniasis. I. TNFα mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v. 69, n. 4, p. 570–573, 1990.

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; et al. Inflammasome-derived IL-1β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–15, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749230>.

LINDGREN, E.; ANDERSSON, Y.; SUK, J. E. J. E. J. E.; et al. Monitoring EU Emerging Infectious Disease Risk Due to Climate Change. **Science**, v. 336, n. 6080, p. 418–419, 2012. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/336/6080/418>.

LINDOSO, J. A.; COTA, G. F.; DA CRUZ, A. M.; et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. June, p. 1–8, 2012.

LOCKWOOD, D.; MOORE, E. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 151, 2010. Disponível em: <http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/151/62883>.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Leishmania invasion and phagosome biogenesis. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 174–181, 2008.

LOPES, M. F.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; DOSREIS, G. A. Innate Immunity to Leishmania Infection: Within Phagocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–7, 2014. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2014/754965/>.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.

MAGALHÃES, L. S. **Caracterização fenotípica de Leishmania infantum obtidas de pacientes refratários ao tratamento com antimonial**. 2016. Universidade Federal de Sergipe, 2016.

MAGALHÃES, L. S.; BOMFIM, L. G.; MOTA, S. G.; et al. Increased thiol levels in antimony-resistant Leishmania infantum isolated from treatment-refractory visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 119–125, fev. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000200119&lng=en&tlng=en>.

MAGALHÃES, L. S.; BOMFIM, L. G. S.; SANTOS, C. N. O.; et al. Antimony resistance associated with persistence of Leishmania (Leishmania) infantum infection in macrophages. **Parasitology Research**, v. 120, n. 8, p. 2959–2964, 17 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07231-7>.

MAHARJAN, M.; SINGH, S.; CHATTERJEE, M.; et al. Role of aquaglyceroporin (AQP1) gene and drug uptake in antimony-resistant clinical isolates of Leishmania donovani. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 1, p. 69–75, jul. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606765>.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

MANDAL, G.; WYLLIE, S.; SINGH, N.; et al. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive Leishmania donovani field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 12, p. 1679–1687, 2007.

MANDAL, G.; SARKAR, A.; SAHA, P.; et al. Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant Leishmania donovani field isolates. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 46, n. 1, p. 86–92, fev. 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x/full>. Acesso em: 16 set. 2014.

MANDAVILLI, B. S.; JANES, M. S. Detection of intracellular glutathione using ThiolTracker violet stain and fluorescence microscopy. **Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]**, v. Chapter 9, n. July, p. 1–8, 2010.

MANSUETO, P.; VITALE, G.; DI LORENZO, G.; et al. Immunopathology of leishmaniasis: An update. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 435–445, 2007.

MARQUES, C. S.; PASSERO, L. F. D.; VALE-GATO, I.; et al. New insights into neutrophil and Leishmania infantum in vitro immune interactions. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 40, p. 19–29, jun. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957115000247>. Acesso em: 14 set. 2015.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M.; SOTO, M.; IBORRA, S.; et al. Leishmania Hijacks myeloid cells for immune escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–16, 2018.

MAZZEO, D.; SACCO, S.; DI LUCIA, P.; et al. Thiol antioxidants inhibit the formation of the interleukin-12 heterodimer: A novel mechanism for the inhibition of IL-12 production. **Cytokine**, v. 17, n. 6, p. 285–293, 2002.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 107, n. 1, p. 7–14, jan. 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3869292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 7 fev. 2016.

MESSARITAKIS, I.; CHRISTODOULOU, V.; MAZERIS, A.; et al. Drug resistance in natural isolates of Leishmania donovani s.l. promastigotes is dependent of Pgp170 expression. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. 11, jan. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475899015161>. Acesso em: 24 jul. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, (BRASIL). **Guia de vigilância epidemiológica: Leishmaniose visceral**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, (BRASIL). Letalidade de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013. **Sinam/Svs**, p. 1, 2019. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Letalidade.pdf>.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153–69, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456028>.

MOREIRA, D. S.; MONTE NETO, R. L.; ANDRADE, J. M.; et al. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World Leishmania spp. susceptible and resistant to antimony. **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v. 3, p. 143–53, dez. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.08.001>. Acesso em: 15 set. 2014.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, dez. 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nri2448>.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286–96, mar. 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x/full>. Acesso em: 15 set. 2014.

MUKHERJEE, B.; MUKHOPADHYAY, R.; BANNERJEE, B.; et al. Antimony-resistant but not antimony-sensitive Leishmania donovani up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 7, p. E575-82, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3574914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MUKHERJEE, B.; PAUL, J.; MUKHERJEE, S.; et al. Antimony-Resistant *Leishmania donovani* Exploits miR-466i To Deactivate Host MyD88 for Regulating IL-10/IL-12 Levels during Early Hours of Infection. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2731–2742, 2015. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1402585>.

MUKHOPADHYAY, R.; DEY, S.; XUT, N.; et al. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in Leishmania. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. September, p. 10383–10387, 1996.

MURRAY, H. W.; CERVIA, J. S.; HARIPRASHAD, J.; et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 3, p. 1183–1192, 1995.

MUXEL, S. M.; AOKI, J. I.; FERNANDES, J. C. R.; et al. Arginine and polyamines fate in leishmania infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2018.

NEAL, R. a; VAN BUEREN, J.; MCCOY, N. G.; et al. Reversal of drug resistance in Trypanosoma cruzi and Leishmania donovani by verapamil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 197–198, 1989.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, mar. 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15301935>. Acesso em: 11 jan. 2016.

NOVAIS, F. O.; SANTIAGO, R. C.; BÁFICA, A.; et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, 2009.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, set. 2007. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490607001834>.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunologic research**, v. 56, n. 1, p. 163–71, maio 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504228>. Acesso em: 7 fev. 2016.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 653–664, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.001>.

OLIVEIRA, F. A. de; BARRETO, A. S.; BOMFIM, L. G. S.; et al. Soluble CD40 Ligand in Sera of Subjects Exposed to Leishmania infantum Infection Reduces the Parasite Load in Macrophages. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. e0141265, 2015. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141265>.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. [s.l: s.n.]

OUALHA, R.; BARHOUMI, M.; MARZOUKI, S.; et al. Infection of human neutrophils with leishmania infantum or leishmania major strains triggers activation and differential cytokines release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–16, 2019.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, 2004.

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B.; KOPF, M.; et al. The Role of IL-12 in Maintaining Resistance to Leishmania major . **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5771–5777, 2002.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L. de; et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, mar. 2011. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742011000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 18 ago. 2015.

PÉREZ-CABEZAS, B.; CECÍLIO, P.; GASPAR, T. B.; et al. Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of Leishmania infantum Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. March, p. 1–14, 2019.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, jan. 2015. Disponível em: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.14.103>.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J.; et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.

PONTE-SUCRE, A.; DIAZ, E.; PADRÓN-NIEVES, M. **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. 1. ed. Vienna: Springer Vienna, 2013.

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; BRODSKYN, C.; et al. New insights on the inflammatory role of Lutzomyia longipalpis saliva in leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

RAI, S.; GOEL, S.; DWIVEDI, U.; et al. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of Leishmania donovani. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74862, jan. 2013. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0065467>. Acesso em: 29 set. 2014.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400018&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 ago. 2015.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.

REGLI, I. B.; FERNÁNDEZ, O. L.; MARTÍNEZ-SALAZAR, B.; et al. Resistance of Leishmania (Viannia) Panamensis to Meglumine Antimoniate or Miltefosine Modulates Neutrophil Effector Functions. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. December, p. 3040, 2018.

REHMAN, K.; WALOCHNIK, J.; MISCHLINGER, J.; et al. Leishmaniasis in Northern Syria during Civil War. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 11, p. 1973–1981, nov. 2018. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/11/17-2146_article.htm>.

REINHARD, K.; HUBER, M.; LOHOFF, M.; et al. The role of NF-κB activation during protection against Leishmania infection. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 302, n. 4–5, p. 230–5, out. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422112000343>. Acesso em: 7 fev. 2016.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.

ROCI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Sub-cellular biochemistry**, v. 74, p. 1–42, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24264239>.

ROMA, E. H.; MACEDO, J. P.; GOES, G. R.; et al. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in Leishmania amazonensis infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 193, 2016. Disponível em: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1472-y>.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100–103, jul. 1989. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014489489901768>. Acesso em: 7 fev. 2016.

SANTOS, M. L. B. **Caracterização fenotípica de isolados de Leishmania chagasi naturalmente resistentes ao antimonial**. 2013. Universidade Federal de Sergipe, 2013.

SANTOS, P. L.; COSTA, R. V.; BRAZ, J. M.; et al. Leishmania chagasi naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide**, v. 27, n. 1, p. 67–71, 30 jun. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089860312000614>. Acesso em: 8 dez. 2015.

SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU, I. V.; OLIVEIRA, F.; et al. Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548–555, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>.

SERENO, D. Leishmania (Mundinia) spp.: from description to emergence as new human and animal Leishmania pathogens. **New Microbes and New Infections**, v. 30, p. 100540, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100540>.

SERENO, D.; HARRAT, Z.; EDDAIKRA, N. Meta-analysis and discussion on challenges to translate Leishmania drug resistance phenotyping into the clinic. **Acta Tropica**, v. 191, n. December 2018, p. 204–211, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.009>.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, p. 412–423, 2009.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name Leishmania (Leishmania) infantum chagasi for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **MEM INST OSWALDO CRUZ**, v. 101, n. 5, p. 577–579, 2006. Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/issues/special-issues/item/880-further-thoughts-on-the-use-of-the-name-leishmania-leishmania-infantum-chagasi-for-the-aetiological-agent-of-american-visceral-leishmaniasis>. Acesso em: 26 set. 2014.

SHIM, H.; FAIRLAMB, a H. Levels of polyamines, glutathione and glutathione-spermidine conjugates during growth of the insect trypanosomatid Crithidia fasciculata. **Journal of general microbiology**, v. 134, n. 3, p. 807–17, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183621>.

SHIO, M. T.; HASSANI, K.; ISNARD, A.; et al. Host Cell Signalling and Leishmania Mechanisms of Evasion. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1–14, 2012. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/819512/>.

SILVA, R. L. L.; SANTOS, M. B.; ALMEIDA, P. L. S.; et al. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2017.

SILVEIRA, F. T.; CORBETT, C. E. P. Leishmania chagasi Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 143–147, 2010.

SINGH, N.; ALMEIDA, R.; KOTHARI, H.; et al. Differential gene expression analysis in antimony-unresponsive Indian kala azar (visceral leishmaniasis) clinical isolates by DNA microarray. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 6, p. 777–87, jun. 2007. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S0031182007002284>. Acesso em: 14 set. 2014.

SINGH, N.; CHATTERJEE, M.; SUNDAR, S. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 596, jan. 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4280036&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 15 out. 2015.

SINGH, N.; CHIKARA, S.; SUNDAR, S. SOLiD Sequencing of Genomes of Clinical Isolates of Leishmania donovani from India Confirm Leptomonas Co-Infection and Raise Some Key Questions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2013.

SINGH, O. P.; HASKER, E.; SACKS, D.; et al. Asymptomatic leishmania infection: A new challenge for leishmania control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1424–1429, 2014.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, J.; GUPTA, A. K.; et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 49, 2017. Disponível em: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-1969-z>.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 dez. 2017. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182000086121>. Acesso em: 10 jul. 2017.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53–63, jan. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23256501>.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, 2017.

TAVARES, L. M. S. de A.; TAVARES, E. D. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do Sus**, v. 8, n. 1, p. 47–52, mar. 1999. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-16731999000100006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 21 set. 2015.

TEIXEIRA, C. R.; SANTOS, C. da S.; PRATES, D. B.; et al. Lutzomyia longipalpis saliva drives interleukin-17-induced neutrophil recruitment favoring Leishmania infantum infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–10, 2018.

TORRENTERA, F. A.; LAMAN, J. D.; VAN MEURS, M.; et al. Endogenous interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of Leishmania mexicana infection in C57BL/6 mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5075–5080, 2002.

TURCANO, L.; TORRENTE, E.; MISSINEO, A.; et al. Identification and binding mode of a novel Leishmania Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1–21, 2018.

VALIATHAN, R.; DUBEY, M. L.; MAHAJAN, R. C.; et al. Leishmania donovani: effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. **Experimental parasitology**, v. 114, n. 2, p. 103–8, out. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489406000440>. Acesso em: 31 ago. 2015.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, jan. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475899015161>. Acesso em: 16 set. 2014.

WHO-PAHO. Leishmaniases : Epidemiological Report of the Americas. **Report Laishmaniases**, v. 1, n. Leishmaniasis report #7, p. 1–4, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Epidemiological situation**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

YAN, S.; LI, F.; DING, K.; et al. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 689–697, 2003.

SOBRE OS AUTORES

LUCAS SOUSA MAGALHÃES - Graduado em Biomedicina pela Universidade Tiradentes, Mestre em Biologia Parasitária e Doutor em Ciências da Saúde, ambos pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Atualmente é pós-doutorando pelo Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da UFS.

CAMILLA NATÁLIA OLIVEIRA SANTOS - Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Sergipe, Especialista em Biologia Molecular e Celular, Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Sergipe. Atualmente é doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFS.

A resistência à droga em parasitos

Leishmania (Leishmania) infantum

e sua relação com a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2022

A resistência à droga em parasitos

Leishmania (Leishmania) infantum

e sua relação com a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2022